

Kudoskuljetusohjelmien vertailu rasvaisilla näytteillä



Koulutusohjelma		Suuntautumisvaihtoehto	
Bioanalytiikka			
Tekijä/Tekijät			
Heinrichs Heidi			
Työn nimi			
Kudoskuljetusohjelmien vertailu rasvaisilla näytteillä			
Työn laji	Aika	Sivumäärä	
Opinnäytetyö	Kevät 2007	45+10 liitettä	
<p>TIIVISTELMÄ</p> <p>Histologisen näytteen valmistukseen kuuluu fiksaatio, kudoskuljetus, valu, mikrotomia ja värjääminen. Kudoskuljetuksen epäonnistuessa kudoksen leikkautuvuus huononee, mikä puolestaan voi vaikuttaa lopullisen leikkeen laatuun ja kudoksen yleisrakenteeseen eli morfologiaan.</p> <p>Työssäni vertaillaan kahta eri kudoskuljetusohjelmaa rasvaisille näytteille ja niiden vaikutusta mikrotomiaan. Kudoskappaleet leikattiin kahteen eri paksuuteen, jolloin voitiin vertailla rasvaisten kudoskappaleiden paksuuden vaikutusta kudoskuljetuksen onnistumiseen ja mikrotomiaan. Vertailun tarkoituksena on tuottaa Päijät-Hämeen Keskussairaalan patologian laboratoriolle tieto, kumpaa ohjelmaa jatkossa tulisi käyttää, kun kysymyksessä on rasvainen näyte.</p> <p>Kudoskappaleet (2-3 mm ja 5-6 mm) kuljetettiin rinnakkaisissa kudoskuljetusohjelmissa kudostenkäsittelyautomaateilla, jonka jälkeen kudokset valettiin parafiiniin. Kaksi laboratoriohoitajaa leikkasi blokeista 4 µm leikkeet vesiliukumikrotomilla ja arvioivat leikkautuvuuden tehtyjen kriteerien mukaan. Leikkeet värjättiin hematoksyliini-eosiini-värjäyksellä. Kaikki lasit arvioitiin tietyillä kriteereillä, jonka jälkeen patologeille valittiin osa lasista arvioitaviksi. Patologit eivät saaneet etukäteen tietoa käytetyistä kudoskuljetusohjelmista, kudoksista tai kudoskappaleiden paksuudesta.</p> <p>Leikkautuvuudessa ei ollut suuria eroja ohjelmien välillä vertailtaessa 2-3 mm paksuisia kudoksia. 5-6 mm paksujen kudosten leikkautuvuudessa erot olivat selkeät ohjelmien välillä. Valmiissa leikkeissä rasvaohjelman läpikäyneet 5-6 mm paksuiset kudokset olivat normaaliohjelmalla kuljetettuja laadukkaampia. Suurin vaikutus rasvaohjelmalla oli leikkeen reikiintymisen ja repeilyn vähenemiseen. Värjäystulokseen kudosten paksuus tai kudoskuljetusohjelmat eivät juurikaan vaikuttaneet.</p> <p>Rasvaohjelma otettiin työn tulosten perusteella käyttöön. Rasvaohjelmaa voidaan jatkossa käyttää yli 3 mm paksuille rasvaisille kudoksille rutiininomaisesti. Rasvaohjelma itsessään toimi hyvin, eikä kaipaakaan muutoksia liuosaikoihin, vaan on osoittautunut vertailussa hyvin toimivaksi. Tulevaisuudessa rasvaohjelman liuosaikoja mahdollisesti lyhennetään siten, että ohjelma kestää kolmen vuorokauden sijaan kaksi vuorokautta.</p>			
Avainsanat			
Kudoskuljetus, kudostenkäsittelyautomaatti, parafiini, mikrotomia, rasva			

Degree Programme in		Degree	
Biomedical Laboratory Science		Bachelor of Health Care Services	
Author/Authors			
Heinrichs Heidi			
Title			
Tissue Processing Programme Comparison with Fat Tissue			
Type of Work	Date	Pages	
Final Project	Spring 2007	45+10 appendices	
<p>ABSTRACT</p> <p>The preparation of an histological sample includes fixation, tissue processing, embedding, sectioning with microtome and staining. If the tissue processing is unsuccessful the possibility to cut the tissue will not be so good, and this can have an effect on the quality of the final paraffin section and on the general composition, in other words the morphology.</p> <p>In my work I compared two tissue processing programmes used on fatty tissues and their effect on the microtome. The tissue pieces were cut into two different thicknesses, so it was possible to compare the effect of the thickness in getting a successful tissue processing and microtome.</p> <p>The comparative test was made for finding out which method would be better to use in future at the pathological laboratory of Päijät-Häme Central Hospital concerning fatty tissues.</p> <p>The 2-3mm and 5-6mm tissue samples went through parallel tissue processing in processing machines. After this the samples were embedded in paraffin wax. Two laboratory technicians cut 4 µm slices from the (blocks) samples with the microtome with a water bridge and made an estimation of how it was to be cut using agreed criteria. The samples were stained by a hematoxylin-eosin-stain. Every slide was estimated by agreed criteria. After this part of the slides were taken to the pathologist for estimation. The pathologist did not get information on which tissue processing was used, neither did he get information on the tissues or of the thickness of the cuttings.</p> <p>There was no big difference between the cuttings with the thickness of 2-3 mm. There was a clear difference between the two programmes when the thickness was 5-6 mm. There was a clear difference in the completed samples that had gone through the fat programme; they had much better quality. The fat programme had most influence in avoiding the holeyness and splitting of the sample. The thickness of the tissue or the tissue processing programmes had insignificant effect on the staining result.</p>			
Keywords			
Tissue processing, paraffin wax, microtomy, fat			

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	2
2	KUDOKSET	3
2.1	Rasvakudos	3
2.2	Adiposyytin kehittyminen	4
2.3	Rintakudos	4
2.4	Suolikudos	5
2.5	Aivokudos	5
2.6	Lipooma ja liposarkooma	6
3	HISTOLOGINEN NÄYTE JA SEN KÄSITTELY	6
3.1	Fiksaatio eli kiinnitys	6
3.2	Makroleikkely	8
3.3	Kudoskuljetus	8
3.3.1	Dehydraatio, eli veden poisto	9
3.3.2	Kirkastus	10
3.3.3	Tukiaineeseen siirto	10
3.4	Kudostenkäsittelylaite	11
3.5	Kudoskuljetus Päijät-Hämeen keskussairaalassa	12
3.6	Valaminen	12
4	KUDOSBLOKKIEN LEIKKAAMINEN JA VÄRJÄÄMINEN	13
4.1	Mikrotomit ja leikkaaminen	13
4.2	Hyvän leikkeen kriteerit	14
4.3	Leikkeen kiinnitys lasille	15
4.4	Hematoksyliini-eosiini-värjäys	15
4.5	Peittäminen ja leikkeen tarkastelu mikroskooppisesti	17
5	TUTKIMUSONGELMAT JA VERTAILU	17
6	VERTAILUN TOTEUTTAMINEN	21
6.1	Arvioinnin kriteerit	23
6.2	Kudoskuljetus, valu ja mikrotomia	23
6.3	HE värjäys, peittäminen ja mikroskopointi	25
7	TULOKSET	26
7.1	Kudoksen paksuuden ja kudoskuljetusohjelman vaikutus leikkautuvuuteen	27
7.1.1	Aivokudokset	29
7.1.2	Rinta- ja suolikudos	31
7.1.3	Lipooma	33
7.2	Lopullisten leikkeiden laatu	34
7.2.1	Leikkeen laatu	36
7.2.2	Kudosmorfologian säilyminen	37
7.2.3	Värjäytyminen	38
7.2.4	Kromatiinin säilyminen tumissa	38
8	JOHTOPÄÄTÖKSET JA VERTAILUN LUOTETTAVUUS	39
9	POHDINTA	41
	LÄHTEET	43
	LIITTEET	1-10

1 JOHDANTO

Histologiset tutkimukset kuuluvat nykypäivän terveydenhuoltoon ja kudospäätteitä tulee patologian laboratorioon runsaasti käsiteltäviksi päivittäin. Kudokäsittelyn automatisoiminen on mahdollistanut suurienkin kudospäätteiden samanaikaisen käsittelemisen. Jotta kudoksesta voidaan saada diagnoosi, täytyy kudos ensin käsitellä teknisesti niin, että patologi voi sen tulkita. Kudokseleikkeen teknisen valmistamisen suorittaa yleensä laboratoriohoitaja.

Aiheen valinta lähti Päijät-Hämeen keskussairaalan (PHKS) patologian laboratorion tarpeista. Laboratoriossa on käytössä kaksi erilaista kudokäsittelyohjelmaa, joita voidaan käyttää rasvaisille kudoksille. Normaali-ohjelmaa käytetään päivittäin rutiininäytteille ja se kestää yön yli kun taas rasvaohjelmaa (3 vrk) käytetään säännöllisesti obduktionäytteille ja makroblokeille. Rasvaisen näytteen käsittely on koettu teknisesti hankalaksi, eikä lopputulos ole aina halutun tasoinen, varsinkaan kooltaan paksuissa näytteissä. Nyt laboratoriossa halutaan vertailla kahta jo käytössä olevaa kudokäsittelyohjelmaa. Ohjelmien erot tunnetaan käytännössä, mutta niitä ei ole vertailtu keskenään. Ei ole voitu osoittaa, tuottaako pidempi kudokäsittelyohjelma paremmin leikkautuvia ja tulkittavia valmisteita kuin normaalisti käytettävä ohjelma.

Kudokäsittelyautomaatti suorittaa kudoksille automaattisesti käyttäjän määrittelemän ohjelman. Käyttäjän tulee vain huolehtia liuosten ja parafiinin puhtaudesta sekä riittävydestä. Kudokäsittely sisältää kolme vaihetta; ensimmäisenä kudosten dehydraation nousevalla alkoholisarjalla, toisena ksyleenisarjan, joka toimii siirtymäliuoksena alkoholien ja parafiinin välillä, sekä viimeisenä vaiheena parafiinin.

Tähän asti kaikki normaaleihin kudokasetteihin pakatut potilasnäytteet on käsitelty normaali-ohjelmalla ja makroblokit sekä obduktioista kerätyt näytteet rasvaohjelmalla. Näytteiden jako tällä tavoin johtuu siitä, että obduktioista kerätyille näytteille ei ole niin kiirettä saada diagnoosia. Rasvaohjelman käyttö aiheuttaa vastausviivettä.

Ohjelmissa käytetyt liuokset ovat toisiaan vastaavia, vain niiden vaikutusajat ovat eripituiset. Vertailulla pyritään osoittamaan, kumman ohjelman käyttö olisi suositeltavampaa, jotta lopputulokseksi saadaan hyvin leikkautuvia sekä hyvänlaatuisia

näytteitä. Koska laboratorio pyrkii toiminnallaan aina mahdollisimman hyvään laatuun, on vertailun suorittaminen perusteltua. Vertailu suoritetaan kahdessa erikseen arvioitavassa vaiheessa.

2 KUDOKSET

Elimistössä on monenlaista kudosta. Erityyppiset kudokset käyttäytyvät kuduskuljetuksessa eri tavoin. Kudoksen ominaisuuksista mm. tiiviys, rasvaisuus ja vesipitoisuus, vaikuttavat kuljetuksen onnistumiseen olennaisesti. Alla olevissa kappaleissa 2.1–2.6, olen selventänyt vertailussa käytettävien kudosten yleisimpiä ominaispiirteitä.

2.1 Rasvakudos

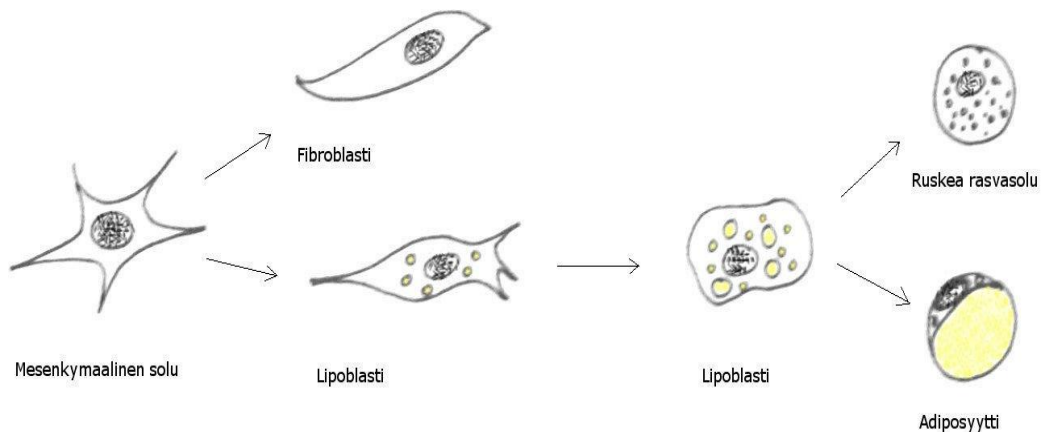
Rasva on tärkeä osa ihmisen lämmönsäätelyjärjestelmää. Aikuisilla rasva on pääasiassa valkeaa, eli lämpöä eristävää. Lapsilla on valkean lisäksi ruskeaa rasvaa, joka tuottaa lämpöä. Rasvan tehtävänä on myös suojata elimistöä ja se on hyvä energian lähde. (Bjålie – Haug – Sand – Sjaastad – Toverud 2002: 19.) Mesenkymaalisista soluista muodostuu lipoblasteja, jotka puolestaan erilaistuvat joko valkeiksi tai ruskeiksi adiposyyteiksi, eli rasvasoluiksi. Toisin kuin muissa sidekudoksissa, rasvakudoksessa on lähes pelkästään adiposyyttejä, joita retikuliinisäikeet ympäröivät. Mesenkymaalinen sidekudos on erilaistumatonta löyhää kudosta, jota on alkiossa. (Kaisto 2006.)

Normaalipainoisella miehellä rasvakudoksen määrä on 15–20 % ja naisella 20–25 % painosta (Junqueira – Carneiro 2005: 123). Rasvasolusaarekkeiden määrä on suhteellisesti vakio jo 24–29 viikon ikäisellä sikiöllä. Aluksi solun sisällä oleva rasvapisara muuttaa solun soikeaksi ja lopulta solun ollessa täynnä rasvaa se on muodoltaan pyöreä. Tuma työntyy aivan solun seinää vasten. Rasvasolut voivat olla halkaisijaltaan suuria, aina 120 µm asti. Hematoksyliini-Eosiini värjäyksessä saadaan näkyviin ainoastaan ohut soluseinä sekä ovaalin muotoinen tasaisen kromatiininen tuma, jossa voi näkyä kirkas vakuoli. Rasvasolu saarekkeita ympäröi ohut kollageenisäie. (Sternberg 1997: 168–169, 171.)

2.2 Adiposyytin kehittyminen

Fibroblasti, joka alkaa muuntua lipoblastiksi, on pitkulainen ja siinä on runsaasti endoplasmista kalvostoa sekä golginlaitteen kalvostoa. Kun solun muuntuminen lipoblastiksi alkaa, lisääntyvät solun sisällä olevat tasapintaiset rakkulat määrällisesti. Samanaikaisesti karkea endoplasmakalvosto vähenee samassa suhteessa. Pieniä rasvahiukkasia alkaa ilmestyä yhteen kohtaan sytoplasmaa. Tässä vaiheessa olevia soluja kutsutaan preadiposyyteiksi tai lipoblasteiksi. (Ross – Romrell – Kaye 1995: 127.)

Solun kerätessä lisää rasvaa sisäänsä, sen muoto muuttuu ovaaliksi ja sytoplasmassa on runsaasti tasaisia rakkuloita ja pieniä rasvapisaroita tuman ympärillä. Pienten pisaroiden yhdistyessä syntyy suurempia rasvapisaroita. Lipoblastin yhä kehittyessä, tasaisia rakkuloita alkaa esiintyä runsaasti, siellä missä karkeaa endoplasmista kalvostoa esiintyy vähiten. Solun koko alkaa kasvaa ja muuttua pyöreäksi, rasvamäärän lisääntyessä tuma sijoittuu eksentrisesti. Valmiin adiposyytin muoto mikroskoopista nähtynä muistuttaa sinettisormusta. (Ross ym. 1995: 127.)



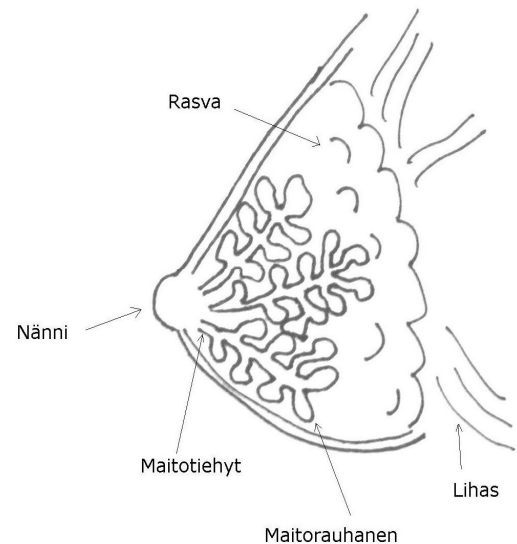
KUVIO 1. Rasvasolun kehitysvaiheet (Junqueira – Carneiro 2005: 126).

2.3 Rintakudos

Rintakudoksessa on maitorauhasia ja -tiehyitä sekä rasvaa. Rintakudos sisältää myös verisuonia, imusuonia ja -solmukkeita sekä hermoja. (Ross ym. 1995: 710–713.) Maitorauhaset koostuvat epäsäännöllisen muotoisista lohkoista, joita erottaa toisistaan

sidekudos. Lohkot ovat haarautuneiden putkimaisten rauhasrakkuloiden täyttämiä. Lohkoissa on sidekudoksen seassa rasvakudosta. Kaikki rauhasrakkulat päättyvät maitotiehyeseen. (Solunetti 2006a.)

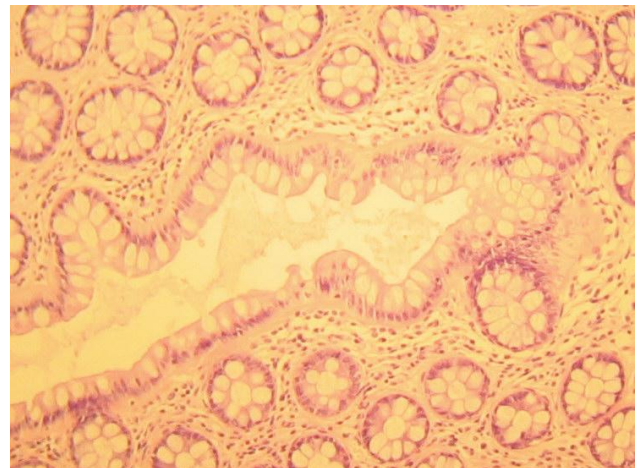
Rintasyöpä on Suomessa yleisin naisilla esiintyvä syöpä. WHO luokittelee rintasyövät kahteen ryhmään. Ensimmäinen ryhmä sisältää ei-invasiiviset karsinoomat ja toinen ryhmä sisältää invasiiviset karsinoomat. (Solunetti 2006b.)



KUVIO 2. Rinnan poikkileikkaus (Modifioitu kuvasta: Surgerydoor 2004).

2.4 Suolikudos

Suoliston seinämän yleisrakenne on samankaltaista koko suolikanavassa. Suolen lumenin puolella on limakalvo (mucosa, kuvio 3), jonka alla on limakalvon alainen kudos (submucosa) ja lihaskerros (lamina propria). Seuraava kudosterros on limakalvonalaiskudosta, jonka jälkeen tulevat pitkittäiset ja poikittaiset lihaskerrokset. Paksusuolen uloimmassa kudosterroksessa, eli herakalvossa (serosa), esiintyy paksusuolelle tyypillisiä rasvakudoksen muodostamia pusseja. (Solunetti 2006e.) Kolorektaalikarsinooman esiintyvyys näyttäisi olevan yhteydessä korkeaan elintasoon. Suomessa kolorektaalikarsinooma on yleisimpiä syöpiä. (Solunetti 2006c.)



KUVIO 3. Suolen limakalvon rauhasrakennetta.

2.5 Aivokudos

Aivokudoksen harmaa-aine muodostuu runsaasti soluja sisältävistä tumakkeista ja kuorialueesta. Valkeassa aineessa sen sijaan on runsaasti myeliinitupellisia aksoneja. Isoaivokuoressa on noin 20 miljardia hermosolua ja pikkuaivokuoressa noin 100 miljardia hermosolua. Näiden lisäksi aivoissa on gliasoluja, jotka muodostavat aksonien

ympärille myeliinitupen. (Bjälle ym. 2002: 58–59, 75.) Neurogliaisolukosta alkunsa saaneita tuumoreita kutsutaan glioomiksi. Yleisin aikuisten aivokasvain (noin 80 %) on astrozytoma. (Solunetti 2006d.) Astrozytoma on astrozyyteistä, eli tähtisoluista (hermotukisolu), koostuva aivo- ja selkäydinkasvain (Duodecim 2007).

Yli puolet aivojen kuivapainosta on rasvaa. Valkean aineen myeliini sisältää proteiineja, kolesterolia ja fosfolipidejä. Johtuen aivokudoksen tiheydestä, dehydraation pitäisi olla hidas. Alkoholipitoisuuksien suuret muutokset aiheuttavat kutistumista ja vääristymistä. Edelleen aivojen käsittelyä hankaloittaa niiden suuri vesipitoisuus, 70–80 % kokonaispainosta. Aivokudoksen käsittelyssä on hyvä huomioda Creutzfeldt-Jakobin taudin tartuntavaara. (Pruitt 1997: 30.)

2.6 Lipooma ja liposarkooma

Lipooma on pehmytkudosten tavallisin kasvain. Lipooma on benigni ja liposarkooma on maligni kasvain. Lipooma ja liposarkooma ovat lähtöisin mesenkymaalisesta solukosta. Lipooma on tarkkarajainen ja näyttää rasvalta, niin mikroskooppisesti, kuin makroskooppisesti. Liposarkooma pinta on epätasainen, sen leikkauspinta on epäsäännöllinen ja muistuttaa vain paikoin rasvaa. Uusia sarkoomatapauksia Suomessa on noin 50 kappaletta vuodessa. (Yleispatologian ATK 7 2005.)

3 HISTOLOGINEN NÄYTE JA SEN KÄSITTELY

Histologinen näyte on joko kokonainen elin, osa siitä (esimerkiksi osa suolesta, kaave näyte kohdusta tai prostatalastu) tai biopsia. Näytteitä otetaan kirurgisesti, tähystyksissä sekä röntgenissä ultraääniohjauksella. (Huhtakallio 1995: 14.)

3.1 Fiksaatio eli kiinnitys

Näyte tulee fiksoida mahdollisimman pian elimistöstä irrottamisen jälkeen, jotta kudoksesta säilyisi mahdollisimman samankaltaisena kuin elimistössä ollessaan. Fiksaatiolla estetään kudoksen autolyysi, eli mätäneminen, pysäytetään kudoksen elintoiminnot ja

kovetetaan kudoks, jolloin kudoksen rakenne säilyy. Kudoksen värjäytyvyys paranee fiksaation ansiosta. Yleensä fiksaatio tehdään kymmenprosenttisella neutraalilla puskuroidulla formaliinillä. (Huhtakallio 1995: 14.) Neutraalilla siksi, että ei muodostuisi haitallista formaliinipigmenttiä, varsinkin jos kyseessä on hyvin verinen kudoks (Stainsfile 2005a). Puskurina käytetään yleisimmin fosfaattia. Puskuroiminen estää formaliinin muuntumisen muurahaishapoksi ultraviolettisäteilyn vaikutuksesta. Valomikroskopiaa varten pH:n suositellaan olevan 7,2–7,4. (Kaila 1998: 12.)

Fiksaatioliuos voi olla additiivinen, jolloin sen ainesosat yhdistyvät kudoksen proteiineihin, tai nonadditiivinen, jolloin yhdistymistä ei tapahdu. Näiden lisäksi fiksaatioaine voi olla koaguloiva tai koaguloimaton. Koaguloiva fiksaatioaine muodostaa proteiineista geelimäisen rakenteen. Formaldehydi on additiivinen ja koaguloimaton fiksaatioaine. (Stainsfile 2005a.)

Formaliinin tunkeutuminen kudoksiin on nopeaa, noin 3 mm tunnissa (Helminen ym. 1986: 30). Formaliinia on oltava tarpeeksi, jotta fiksoituminen olisi tehokasta, mieluiten jopa kymmenkertainen määrä näytteeseen nähden (Lounatmaa – Rantala 1996: 46). Vaikka formaliiini tunkeutuukin kudoksiin nopeasti ja kudoks vaihtaa sen myötä väriä, ei tämä vielä tarkoita, että kudoks olisi fiksoitunut. Koska fiksaatio perustuu kemialliseen reaktioon, vie reaktion tapahtuminen oman aikansa. Esimerkiksi 1 mm paksuinen ohutneulanäyte vaihtaa väriä tunnissa, mutta sen suositeltava fiksointiaika on vähintään vuorokauden verran, jolloin kemialliset reaktiot ehtivät tapahtua. (Stainsfile 2005a.) Löyhärakenteisiin kudoksiin fiksaatioaine tunkeutuu paremmin kuin tiiviisiin. Tiiviitä kudoksia ovat esimerkiksi rusto jänne ja iho. Rauhaskudokset ovat puolestaan rakenteeltaan löyhempiä. (Helminen 1986: 30.)

Fiksaatio on mahdollista tehdä myös jäädyttämällä kudoks nopeasti. Immunohistokemiallisissa tutkimuksissa voidaan joskus löytää jääleikkeeltä sellaisia antigeeneja, mitkä ovat huuhtoutuneet pois formaliinifiksoiduista leikkeistä. Fiksaatiomenetelmä tulee siis valita tarkoituksenmukaisesti. (O’Leary 2003: 102.) Jääleikkeen laatu ei vastaa formaliinikäsitellyn leikkeen laatua (Karttunen – Soini – Vuopala 2005: 291).

Formaliinifiksaatiossa kudoksen proteiinien aminoryhmät reagoivat formaliinin aldehydiryhmien kanssa ja muodostavat verkkorakenteen, tapahtumaa kutsutaan

verkkopolymerisaatioksi (Junqueira – Carneiro 2005: 1). Kun polypeptidiketjujen pääteryhmien välille muodostuu metyleenisiltoja, ne sitovat kudoksen rakenteen ja säilyttävät sen morfologian. Hiilihydraatit eivät fiksoidu tietyllä reaktiolla, mutta glykoproteiinit fiksoituvat kuten proteiinitkin ja verkkomainen rakenne sitoo glykogeenin. Suurin osa lipideistä jää fiksoitumatta ja huuhtoutuu myöhemmissä käsittelyissä pois. Ylifiksaatiossa polypeptidiketjujen kaikki pääteryhmät ovat metyleenisiltojen käytössä, mikä aiheuttaa ongelmia värjäysvaiheessa. Heikkoja metyleenisiltoja voidaan poistaa hyvällä aqua-huuhtelulla. (Stainsfile 2005a; Kaila 1998: 9–13.)

3.2 Makroleikkely

Patologi valitsee fiksoidusta kudoksesta sopivan kokoisen palan käsittelyä varten. Kudoksen tulee olla kauttaaltaan fiksoitunut ennen käsittelyä. Leikattu kudospala laitetaan tunnistetiedoin varustettuun kudoskasettiin. Kudos ei saa kuivua missään vaiheessa, joten täytetty kasetti laitetaan kymmenprosenttiseen formaliiniin odottamaan kuduskäsittelyautomaattiin siirtoa. Kasetteja ei saa ylitäyttää, vaan kudoksen ja kasetin väliin on jätävä liikkumatilaa, jolloin liuosten vaihto kasetin sisällä on tehokkaampaa. Näin taataan laadukas prosessointi. (Bancroft 2002: 85–86.)

3.3 Kudoskuljetus

Kudoskuljetus-termillä tarkoitetaan tässä työssä kaikkia niitä kuduskäsittelyn vaiheita, jotka tapahtuvat kudostenkäsittelyautomaatissa. Kudoskuljetuksen ideana on poistaa kudoksesta vesi ja korvata se tarpeeksi kovalla väliaineella, joka tukee kudosta leikattaessa. Väliaine ei kuitenkaan saa olla niin kovaa, että se vaurioittaisi kudosta tai leikkuussa käytettävää veitsee. Rutiinisti histologisissa näytteissä käytetään väliaineena parafiinia. Jotta parafiinin siirtäminen kudokseen olisi mahdollista, tarvitaan riittävän pituiset vaiheet kussakin liuoksessa. Vaiheiden pituus on riippuvainen kudospalan koosta. Käsittelyn ensimmäinen liuos on usein kymmenprosenttinen formaliini, siinä näytteet säilyvät hyvin jos ohjelma aloitetaan ajastetusti. (Bancroft 2002: 86–87, 91.)

Kaisi Kailan tutkimuksessa, todetaan, että rasvaisille näytteille on saatu parempi

leikkautuvuus mikrotomiavaiheessa, kun sataprosenttisen etanolin vaikutusaikaa pidennettiin kudoskuljetuksessa. Hän arvioi, että etanoli saattaisi poistaa rasvaa kudoksista, jolloin hyvin leikkautuva parafiini korvaa rasvan. Tutkimuksessa todetaan myös pidempien ksyleeniaikojen (yli 2 tuntia), parantaneen rasvaisten ihonäytteiden leikkautuvuutta. (Kaila 1998: 89.)

On olemassa paljon erilaisia kudoskuljetusohjelmia. Monet näistä on kehitetty oman laboratorion käyttöön. Ohjelmien syntyyn vaikuttavat monet asiat, kuten käytetyt liuokset, laitteet ja käsiteltävien kudosten koko. On myös kehitetty muutamia seikkoja, jotka tehostavat eri käsittelyvaiheita. Näiden avulla kudoskuljetus on mahdollisimman tehokasta, mahdollisimman lyhyessä ajassa.

Agitaation, eli säännöllisin väliajoin tapahtuvan liikkeen, tarkoitus on liikuttaa kudoskäsittelykammiossa olevaa nestettä, jotta sen siirtyminen kudoksiin olisi mahdollisimman tehokasta. Liikkeen tulee olla riittävää, jotta siitä on hyötyä. Se ei saa kuitenkaan olla liiallista, etteivät pienet kudoscappaleet vaurioituisi. Lämmöllä tehostetaan liuosten vaihtoa kudoksiin. Lämmön kanssa on oltava varovainen, sillä liuokset ovat helposti syttyviä. Liuosten viskositeetti tulisi olla mahdollisimman alhainen, jolloin liuosten vaihto kudoksiin olisi mahdollisimman tehokasta. (Bancroft 2002: 86.)

Vakuumilla, eli alipaineella saadaan liuokset, varsinkin parafiini, siirtymään kudokseen paremmin. Rasvaisissa kudoksissa kuten aivot, on saatu hyviä tuloksia, kun vakuumi on lyhentänyt parafiinin impregnoitumisaikaa. Vakuumilla on myös tärkeä asema ilmakuplien poistamisessa kudoksista. Ilmakuplat aiheuttavat valmiiseen leikkeeseen tyhjän kohdan, joten on tärkeää, ettei ilmakuplia jäisi näytteeseen. Suurinta hyötyä vakuumista on keuhkoille, lihaksille, pernalle, dekalsoiduille luille, iholle ja keskushermoston kudoksille. (Bancroft 2002: 86–90.)

3.3.1 Dehydraatio, eli veden poisto

Kudoksille suoritetaan dehydraatio alkoholisarjalla. Sarja voi olla nouseva lähtien 70–prosenttisesta etanolista, edeten sataprosenttiseen etanoliin. Liuoksia on aina sarja, sillä alkoholin siirtyminen kudokseen perustuu pitoisuuserojen tasoittumiseen ympäröivän

liuoksen ja kudoksen välillä. Sarjan ensimmäiset alkoholit siis laimenevat käytössä. Lämmön tai vakuumin käyttö alkoholien kohdalla ei ole tarpeen, jos palat ovat riittävän pieniä ja kudokset hyvin fiksoituneet. (Bancroft 2002: 86–87, 91.)

3.3.2 Kirkastus

Dehydraation jälkeen, kudoksille suoritetaan kirkastusliuoksella, jonka tulee olla sekä alkoholiin että parafiiniin täysin liukeneva. Kirkastusaineen valintaan vaikuttavat: Kyky poistaa dehydraatioliuos kudoksesta, sen hyvä poistuminen kudoksesta parafiinin tieltä, mahdollisimman vähäiset kudosaauriot, syttymisherkkyys, myrkyllisyys sekä hinta. Tähän tarkoitukseen käytetään useimmiten ksyleeniä. Kirkastus perustuu siihen, että ksyleenillä on sama valontaittoindeksi kuin proteiineilla. (Bancroft 2002: 86–87.)

Ksyleeni koostuu dimetyylibentseeneistä, jotka kirkastavat kudoksen, eli tekevät sen läpikuultavaksi. Tässä vaiheessa itse kirkastumisella ei ole kovin suurta merkitystä, kun taas väliliuottimena toimiminen on pääasia. Kudosta ei saa pitää liian pitkiä aikoja ksyleenissä, koska se aiheuttaa kemiallisia muutoksia kudoksessa, jotka johtavat kudoksen kutistumiseen ja kovettumiseen. (Aho 1990: 13.)

Ksyleenin lisäksi on olemassa muitakin kirkastusaineita. Tolueenilla on samankaltaiset ominaisuudet kuin ksyleenillä, mutta se aiheuttaa vähemmän vaurioita kudokseen pitkäaikaisessa käsittelyssä. Kloroformi on hitaampi käytössä kuin ksyleeni, mutta aiheuttaa vähemmän haurastumista kudoksille. Kloroformi ei ole helposti syttyvää mutta sen haittana on toksisuus. Sitrusöljy puolustaa paikkaansa taloudellisenä ja myrkyttömänä vaihtoehtona, sitä saadaan appelsiinin ja sitruunan kuorista. Sitrusöljyjen huonoina puolina on melko vahva tuoksu ja sen kyky liuottaa kudoksista pois pieniä mineraaleja, kuten kuparia ja kalsiumia. Se voi vaikuttaa myös värjäystulokseen. (Bancroft 2002: 88.)

3.3.3 Tukiaineeseen siirto

Lopuksi ksyleeni korvataan sulalla parafiinilla. Jokaisen vaiheen tulee olla riittävän pitkä, jotta liuosten vaihtuminen on täydellistä. Parafiini on suosittu tukiaine, koska sen viskositeetti on alhainen parafiinin ollessa nestemäistä. Alhainen viskositeetti parantaa

liuoksen impregnoitumista, eli siirtymistä kudoksiin. (Bancroft 2002: 86, 89.)

Parafiini valitaan laboratorioissa käsiteltävien kudosten mukaan. Rasvalle sopii parhaiten korkeamman sulamispisteen parafiinit, joiden runsas polymeerirakenne tukee hyvin kudosta. Erilaisten aineiden lisääminen parafiiniin on mahdollistanut hyvin ohuiden leikkeiden teon (2–5 µm). Parafiinissa hiiliketjut ovat toisissaan kiinni kovalenttisin sidoksin, eli hiiliketjuilla on yhteisiä elektroneja. Kovalentit sidokset ovat epästabiileja ja helposti rikottavissa, esimerkiksi lämmöllä. Jäähdyessään parafiini kutistuu enintään 15 % tilavuudestaan. (Mondragon 200: 34.)

3.4 Kudostenkäsittelylaite

Suljettu kudostenkäsittelylaite on oma ohjausyksikkönsä. Ohjausyksikkö sisältää lämmitetyn reaktiokammion, lämmitetyt vaha-astiat, reagenssipulloveraston sekä varustelaatikon. (Shandon 1997: 1.4–1.5.) Kudoskaseteille on varattu koreja, joiden avulla kasetteja on helppo siirtää kammioon ja ottaa sieltä pois. Korit täytetään keskenään tasaisesti, jotta kuljetuksessa liuosten liikkuminen kasettien ympärillä olisi mahdollisimman tasaista. Korit voivat olla järjestyksessä täytettäviä tai summittain täytettäviä. Laitteeseen on mahdollista tallentaa useampi ohjelma valmiiksi helpottamaan ja nopeuttamaan käyttöä. Jokaisen prosessoinnin jälkeen laite puhdistetaan erillisillä huuhteluohjelmilla, näin vahat poistuvat reaktiokammioista ja putkistoista. Järjestelmän ilmatiiviys ja reagenssien laatu vaikuttaa prosessitulokseen. Laite ja tarvikkeet on syytä pitää hyvässä kunnossa laadukkaan lopputuloksen takaamiseksi. Laitteen oma laaduntarkkailuohjelma auttaa käyttäjää seuraamaan reagenssien käyttöä. (Shandon 1997: 1.4–2.12, Thermo 2006: 17, 29, 69.)

Hiilisuodatin on osa ilmatiivistä järjestelmää, joka toimii hätäsuojana. Jos järjestelmään tulee tukos, se poistaa höyryt ilmasta paineentasausventtiilin toimiessa. Höyryloukkupullo estää lauhteen kerääntymisen ilmaputkiin. Ilmapussi tasaa ilmatiiviin järjestelmän ilmamäärän muutoksia, jotka tapahtuvat lämpötilan muutosten tai paineenvaihteluiden takia. (Shandon 1997: 2.16–2.17.)

Uudemmissa laitteissa voidaan seurata alkoholin pitoisuuksia ominaispainon avulla. Tämä mahdollistaa pelkän absoluuttisen etanolin käyttämisen. Laite aloittaa nousevan

alkoholisarjan aina vanhimma etanolista lähtien, joka on noin 75 prosentista. (Thermo 2002: 7, 13.)

3.5 Kudoskuljetus Päijät-Hämeen keskussairaalassa

Käytössä olevat kudostenkuljetusohjelmat aloittavat ohjelman formaliinilla. Tämä sen vuoksi, että kudokset asetetaan koneeseen jo päivällä ja ohjelma käynnistyy myöhemmin illalla ajastettuna. Näytteet säilyvät hyvinä formaliinissa. Formaliinin jälkeen tulee vesihuuhtelu, näin ensimmäiseen alkoholiin ei siirry formaliinia. Ohjelmien vaiheet ja kestot on esitetty liitteessä 1.

Vertailussa tulen käyttämään Thermon valmistamia ja merkiltään Shandon Excelsior ja Shandon Exelcior ES kudostenkäsittelylaitteita.

3.6 Valaminen

Näytteet valetaan parafiiniin, jotta ohuiden leikkeiden tekeminen mikroskopiointia varten olisi mahdollista. Parafiini on suosituin tukiaine, sillä se on halpaa, helposti käsiteltävää ja sillä on laaja sulamispisteiden vaihtelu. Parafiinin sulamispiste on yleensä 40–70°C, mitä alhaisempi sulamispiste, sen pehmeämpi parafiini. Yleisimmin käytettyjen parafiinien sulamispiste on 54–58 °C. (Bancroft 2002: 89.)

Valamisessa käytetään valukeskusta. Valukeskukseen kuuluu lämpölevy, kylmälevy sekä vahan annostelija. Kudospalalle valitaan sopivan kokoinen muotti, johon lasketaan sulaa vahaa. Kudospala asetellaan muottiin oikeaan asentoon, leikkauspinta alaspäin. Kudospala kiinnitetään muotin pohjalle pitämällä muottia hetki viileälevyllä, samalla kudospalaa painetaan atuloilla pohjaa vasten. Tunnistetiedoin varustettu kasetti asetetaan muotin päälle ja täytetään parafiinilla joka jäähtyessään kiinnittää kasetin ja kudospalan toisiinsa. Muotti asetetaan kylmälevylle ja parafiinin annetaan kovettua nopeasti ennen irrotusta. Tämän jälkeen näyte on valmis leikattavaksi. (Bancroft 2002: 89, Tissue-Tek® a: 26–27.)

4 KUDOSBLOKKIEN LEIKKAAMINEN JA VÄRJÄÄMINEN

Parafiiniblokkien leikkaaminen tehdään tähän tarkoitukseen suunnitellulla mikrotomilla. Mikrotomin on kehittänyt Charles Chevalier (1804–1859). Laitteen rakentamisen hän aloitti vuonna 1825, mutta nimesi sen vuonna 1839 (Danchin 2002). Kertakäyttöiset veitset ovat mahdollistaneet todella ohuiden leikkeiden teon, 2 µm leikkeetkin onnistuvat helposti. Kertakäyttöveitset ovat myös edullisia käytössä. Leikkaamiseen käytetään erityyppisiä mikrotomeja, sillä erilaiset materiaalit asettavat niille erilaisia vaatimuksia. (Bancroft 2002: 95.)

Leikattaessa tarvitaan mikrotomin lisäksi kylmä- ja kuumavesihauteet sekä kylmä- ja lämpölevy. Muita tarpeellisia tarvikkeita ovat objektilasit, siveltimet, teräviä veitsiä ja tussi. Tarvikkeet on hyvä kerätä leikkauspisteeseen valmiiksi ennen töiden aloitusta. (Bancroft 2002: 95.)

4.1 Mikrotomit ja leikkaaminen

Liukumikrotomi ei nykyisin ole kovin yleinen, sillä se on huomattavasti vaarallisempi kuin esimerkiksi rotaatiomikrotomi. Sen veitsen kiinnitysmekanismi on hankalampi ja terän liike edes takaisin paikallaan pysyvän blokin yli tekevät siitä vaarallisemman, kuin muut mikrotomityypit. (Bancroft 2002: 95.)

Rotaatiomikrotomi on nykyisin suosituin mikrotomityyppi parafiiniblokkien rutiini leikkaamisessa. Sen kyky leikata kovia kudoksia yhdessä virheettömän leikkuutuloksen kanssa tekee siitä monikäyttöisen. Rotaatiomikrotomi leikkaa hyvin myös hartsiin valettuja kudoksia. (Bancroft 2002: 94.) Rotaatiomikrotomissa veitsi pysyy paikallaan ja näyte liikkuu pystysuoraan sitä kohti (Lounatmaa – Rantala 1996: 49). Rotaatiomikrotomi voi olla myös niin kutsuttu vesikourumallinen (kuvio 6 s. 25). Silloin tasainen vesivirta vetää leikkeen suoraksi jo sitä leikattaessa ja kuljettaa leikkeet leikkeenkuljetinsiltaa pitkin vesialtaaseen. Altaan veden lämpötilan voi säätää sopivaksi lämpötilansäätöyksiköstä. Virtaava vesi avaa leikkeet hyvin, joka mahdollistaa ohuiden ja korkealaatuisten leikkeiden teon. Vedenkierto toimii pumpun avulla ja virtauksen voimakkuutta voidaan säädellä. (Oriola: 1.)

Kylmälevyllä jäädytetty blokki asetetaan mikrotomissa olevaan pidikkeeseen ja kiinnitetään veitsi paikoilleen. Veitsen kulma säädetään sopivaksi. Blokin pinta trimmataan suuremmalla leikepaksuudella noin (15 µm) kunnes kudoksen koko pinta tulee leikkeeseen mukaan. Blokin on syytä olla kunnolla kylmä ohuita leikkeitä leikattaessa, sillä silloin kudoksen ja parafiinin tiheys on samanlaiset. Samalla kudokseen siirtyy hiukkasen vettä ja turvottaa sitä, jolloin leikkaaminen helpottuu. Leikepaksuus on useimmiten 3–4 µm. Leikkuunopeus vaikuttaa lopputulokseen ja kokemus opettaa parhaiten oikean nopeuden. Hyvänä nyrkkisääntönä voidaan pitää, että mitä pehmeämpi kudos sitä hitaampi leikkuuliike. Sileän leikkeen saaminen on joskus vaikeaa, silloin kannattaa kokeilla kevyttä tasaista puhallusta kohti leikettä samalla kun sitä leikataan. (Bancroft 2002: 97.)

Leikkeet irrotetaan terästä yksittäin tai nauhana siveltimellä ja siirretään kylmävesihauteeseen kiiltävä puoli alaspäin. Leikkeet järjestetään halutulla tavalla lasille ja siirretään lämpimään vesihauteeseen oikeenemaan. (Aho 1990: 16.) Yleensä noin 30 sekuntia riittää tähän. Oikenemista voi auttaa leikettä kevyesti silveltimillä venyttäen, kun parafiini on pehmennyt. Vesi poistaa pintajännityksen ja sieltä on hyvä valita parhaat leikkeet. Lämminvesihauteen lämpötila tulee olla noin 10 °C alhaisempi kuin parafiinin sulamispiste, jotta parafiini ei sula veteen ja kudos hajoaisi. Vedenpinta puhdistetaan blokkien välillä sellulla kontaminaatioiden estämiseksi. (Bancroft 2002: 95, 97.)

4.2 Hyvän leikkeen kriteerit

Hyvä leike on tasaisen ohut joka kohdasta ja sen tulee olla rypytön ja ehjä. Siinä ei saa olla naarmuja tai raitoja, jotka aiheutuvat vioittuneesta veitsen terästä. Leike ei saa repeillä tai halkeilla, eikä siitä saa puuttua osia. Kudos ei saa laajeta lämpöhauteessa eikä siitä saa löytyä toisten leikkeiden kappaleita tai vierasmateriaalia. Leikkeen ja objektilasin väliin ei saa jäädä ilmakuplia. Leikkeet tulee myös asetella lasille sovittuun järjestykseen, jolloin patologi tietää miltä tasolta sarjaleikkeet ovat. (Päijät-Hämeen Keskussairaala, laatukäsikirja.)

4.3 Leikkeen kiinnitys lasille

Leike kerätään puhtaalle objektilasille, kuivataan ja kiinnitetään lasille, joko lämpölevyllä tai lämpökaapissa. Leikkeen ja lasin väliin jäävä pieni määrä vettä auttaa leikettä oikeenomaan kuivatuksen aikana. Kuivatuksessa lämpötilan tulee olla sama kuin parafiinin sulamispiste. (Bancroft 2002: 97.) Tavallisimmin käytetään millimetrin vahvuista objektilasia 26 x 76 mm. Koska mikroskooppien valmistajat ovat huomioineet objektilasille nämä vakioimitat, ovat poikkeamat vakioimitoista, varsinkin vahvuudesta, haitallisia. (Lounatmaa – Rantala 1996: 50.)

Leikkeen pysymistä lasilla voidaan lisätä erilaisilla adhesiiviaineilla, kuten APES:illa (3-aminopropyltriethoxysilane). Adhesiivilasien käyttö estää leikkeiden irtoamista värjäyksissä, kun käytetään esimerkiksi voimakkaita emäksisiä liuoksia tai kun kudokset on dekalsoitu. (Bancroft 2002: 96.)

4.4 Hematoksyliini-eosiini-värjäys

Hematoksyliini-eosiini (HE) värjäys on yleisin histologinen värjäysmenetelmä laboratorioissa. Värjäyksellä saadaan käsitys kudoksen yleisrakenteesta eli morfologiasta. Koska hematoksyliini on emäksinen, se värjää happamia kudskomponentteja, kuten nukleiinihappoja. Tämän vuoksi hematoksyliiniä käytetään tumaväriinä. Eosiini puolestaan on hapan väriaine, jolloin se värjää emäksisiä kudoksosia, kuten sidekudosta, lihasta ja eosinofiilejä. Hematoksyliiniä voidaan käyttää myös ilman mordanttia, silloin se värjää erilaisia mineraaleja, kuten kalsiumia, rautaa, lyijyä ja kuparia. Värjäytymisen tuloksessa kiinnitetään huomiota tumien terävään värjäytymiseen. Eosiinin oikea-aikainen differentaatio vaikuttaa suuresti värjäyksen lopputulokseen. (Naukkarinen 2000: 153.)

Värjääminen aloitetaan poistamalla parafiini leikkeistä ksyleenillä ja suorittamalla hydraatio laskevalla alkoholisarjalla. Värjäys suoritetaan ohjeen mukaan. Lopuksi tehdään dehydraatio nousevalla alkoholisarjalla ja viimeisenä liuoksena on ksyleeni. Ksyleeni kirkastaa kudoksen ja toimii optisen väliaineen liuottimena. (Ross ym. 1995: 2.)

Onnistuneessa värjäyksessä tumat värjäytyvät sinisiksi tai punertavan sinisiksi, lima-aineet vaaleansinisiksi, kalkki punaviolettiksi ja kollageenisäikeet, fibriini, punasolut, sytoplasmat värjäytyvät punaisen eri sävyillä.

Hematoksyliiniä saadaan *Haematoxylon campechianum* -puun sydänpuusta. Hematoxylon sana tulee kreikan sanoista *haimatos*, joka merkitsee verta ja *xylon*, joka merkitsee puuta. (Stainsfile 2005b.) Luonnonvaraisena sinipuuta kasvaa Keski-Amerikassa sekä Länsi-Intiassa ja kasvatettuna Länsi-Intian saaristossa sekä Meksikossa. Hematoksyliini on väritöntä, mutta altistuessaan ilmalle se muuttuu tummanpunaiseksi. (Hintsanen 2006.) Hematoksyliinistä tulee hapettumisen eli oksidaation tuloksena hemateiinia, joka on värjäävä aine. Hapettuminen voi tapahtua joko luonnollisesti tai kemiallisesti. Luonnollinen hapetus kestää pitkään, kolme – neljä kuukautta, mutta sen etuna on pysyvämpi väri. Kemiallisesti hapetetun hematoksyliinin etuna on välitön käyttövalmius ja haittana rajoitettu käyttöikä. (Helminen ym. 1986: 88.)

Hematoksyliiniä käytetään yleisimmin tumavärinä. Hemateiini on kationinen väriaine ja sillä on huono kudosaaffiniteetti, siksi se tarvitsee peitta-aineen eli mordantin. Peitta-aine ja hemateiini muodostavat kompleksin, joka kiinnittyy kudokseen oletettavasti kovalenttisen sidoksen avulla. Hematoksyliinit jaetaan käytetyn peitta-aineen mukaan. Yleisimmin käytettyjä ovat rautahematoksyliinit ja alumiinihematoksyliinit. (Bancroft 2002: 125.)

Hematoksyliinillä voidaan värjätä joko progressiivisesti (etenevä värjäys) tai regressiivisesti (ylivärjäys eli taantuva värjäys). Progressiivisessa värjäysmenetelmässä ylimääräinen, tarttumaton väriaine huuhdotaan pois, kun taas regressiivisessä menetelmässä suoritetaan kudokseen ylimäärin tarttuneen värin differentaatio. Hematoksyliini voidaan differentoida hapolla, koska väriaine itsessään on emäksinen. (Horobin – Bancroft 1998: 88–89.) PHKS:ssa käytetään Mayer'sin hematoksyliiniä, jonka peitta-aineena on alumiini.

Eosiini on saanut nimensä kreikkalaiselta aamuruskon jumalalta *Eos*, sillä häneen liitettiin ruusunpunertava aamutaivas (Hintsanen 2006). Tavallisimmin HE värjäyksessä käytetään eosiini Y:tä eli etyylieosiiniä. Se on sekä vesi- että alkoholiliukoinen. (Stainsfile 2005b.)

Eosiini on hapan, eli anioninen, väriaine. Se muodostaa kudoseosinaatteja emäksisten kudskomponenttien kanssa. Eosiini toimii sekundaarisena täyttövärinä. Punaisesta väristä saadaan kirkkaampi ja terävämpi, kun siihen lisätään vähän etikkahappoa. (Houtsonen 2004: 4–5.)

4.5 Peittäminen ja leikkeen tarkastelu mikroskooppisesti

Valmiit värjätyt lasit peitetään ohuilla peitinlaseilla tai kalvolla. Optisen väliaineen taitekertoimien tulee olla lähellä proteiinien taitekerrointa (1.53 – 1.54). (Woods – Ellis 1994: 4.6–1.) Optisena väliaineena voidaan käyttää esimerkiksi mountexia tai pertexiä jos peittäminen tehdään käsin. Väliaine ei saa muuttaa näytteen ominaisuuksia, kuten aiheuttaa kiteitä, kutistumista tai lohkeilua, eli sen tulee olla inaktiivista. Väliaineessa ei saa olla mikrobikasvua kontaminanttina, eikä se saa aiheuttaa näytteessä fysikaalisia muutoksia (oksidaatio) tai kemiallisia muutoksia (pH-arvon muutokset vaikuttavat värisävyihin). Histologisia näytteitä säilytetään vuosia ja väliaineella on tärkeä merkitys näytteen säilymiselle. (Woods – Ellis 1994: 4.6–1–2.)

Peitinlasin koko valitaan peitettävän alueen koon mukaan. Peitinlasi toimii tavallaan mikroskoopin ensimmäisenä objektiivina ja sen vuoksi peitinlasin paksuus on lähes aina 0.17 mm. (Woods – Ellis 1994: 4.6–6.)

Näyte katsotaan ensin pienellä suurennoksella, yleensä 10x, tarkoituksena on tarkastella aluksi näytteen yleisrakenne. Tarkemmat yksityiskohdat katsotaan 20x tai 40x suurennoksella. Kun näyte on valmistettu oikein, voidaan 1500-kertaisella suurennuksella päästä jopa 0.2 μm erotuskyvyn rajalle. Vain harvoin tarvitaan suurempaa kuin 40x suurennosta tavallisessa työskentelyssä. (Lounatmaa – Rantala 1996: 55.)

5 TUTKIMUSONGELMAT JA VERTAILU

Rasvaisen kudoksen käsitteleminen on hankalaa ja sen leikkaaminen lähes mahdotonta, jos fiksaatiota ja kuduskäsittelyä ei ole suoritettu kunnolla. Eri kudokset vaativat erilaisia käsittelyaikoja, mutta käytännössä tällainen toiminta ei ole mahdollista, saati

kannattavaa. Tarkoituksena onkin selvittää, vaikuttaako kudokäsittelyajan pidentäminen näytteen käsiteltävyyteen sekä edustavuuteen. Keskeisin ongelma PHKS:n patologian laboratoriossa on ollut näytteen käsittely mikrotomiassa, eli ongelma on yleensä tekninen. Teknisen käsittelyn ongelmat ovat aiheuttaneet vain harvoin ongelmia diagnosointiin. Keskeisten, teknisten käsittelyongelmien, pohjalta muotoutuivat seuraavanlaiset tutkimusongelmat:

1. Laboratoriohoitajan arvio, minkälaisia eroja kudosten leikkautuvuuteen saadaan, kun käytetään rasvaisen näytteen kudokäsittelyohjelmaa normaalin ohjelman tilalla?
2. Minkälaisia eroja saadaan kudokäsittelyn lopputulokseen, kun käytetään kahden paksuisia kudokappaleita?
3. Lopullisen leikkeen laadun arviointi ennalta määritellyin kriteerein (liite 3). Onko eri ohjelmilla kuljetetuissa kudoksissa tulkinnan kannalta eroa?

Tehtävässä vertailussa on monta vaihetta ja osa-aluetta, teorian tietoa on kerätty kaikista vaiheista. Vertailussa käytetään kahta kudokäsittelyohjelmaa ja muut työvaiheet pyritään vakioimaan mahdollisimman samankaltaisiksi kuin rutiininäytteiden normaalit työvaiheet. Kaikki kudokset valitaan jo tehdyn diagnoosin perusteella vertailuun, eikä niiden fiksaatioaikaan voida vaikuttaa.

Laboratoriossa on kolme kudokäsittelyautomaattia käytössä. Vertailussa käytetään kahta laitetta, joissa kuljetetaan samanaikaisesti myös potilasnäytteitä. Kudostenkäsittelylaitteet toimivat molemmat keskenään samalla periaatteella, joten lopputuloksessa päästään vertailemaan liuosaikojen merkitystä. Laitteissa käytetyt liuokset ovat toisiaan vastaavat.

Koska vertailulla pyritään saamaan selville normaalitilanteessa tapahtuvien kudokäsittelyohjelmien erot, tehdään kaikki vaiheet mahdollisimman samoin kuin rutiinissakin. Tämän vuoksi patologi suorittaa osittain näytteiden makroleikkelyn kudokasetteihin, jonka jälkeen kasetit laitetaan fiksaatioliuokseen. Patologi valitsee jo fiksoiduista näytteistä sopivan kokoisia paloja vertailun materiaaliksi. Osan paloista leikkaan itse kudoksista, jotka saan tarkoitusta varten patologilta tai laboratoriohoitajalta. Rinnakkaiset kudospalat otetaan, jos mahdollista, leikkuupinnan molemmin puolin, jolloin verrattavat näytepalat ovat mahdollisimman paljon toisiaan vastaavat. Palat leikataan 2–3 mm ja 5–6 mm paksuisiksi, paksummat palat ovat siis

niin paksuja, että osittain pursuavat kuduskasetin rei'istä. Palojen pituus ja leveysmitat vaihtelevat. Leikatut kudospalat asetetaan tunnistetiedoin varustettuihin kasetteihin leikkuupinta alaspäin.

Kudokset kuljetetaan kuduskäsittelyautomaatissa kahdella eri ohjelmalla. Ohjelman päätyttyä kudokset valetaan parafiiniin leikkuupinta alaspäin. Tämän jälkeen kaksi laboratoriohoitajaa leikkaa blokeista 4 µm paksuiset leikkeet lasille ja arvioi jokaisen blokin leikkautuvuuden erikseen ennalta määritellyin kriteerein (liite 2). Valmiit leikkeet kiinnitetään lasille samoin kuin potilasnäytteet ja värjätään niiden rinnalla värjäysautomaatilla hematoksyliini-eosiini värjäyksellä. Värjättyt lasit peitetään peitinkalvoautomaatilla, eli samoin kuin rutiininäytteetkin. Leikkaamisen kriteerit olen koostanut hyvän leikkeen kriteerien mukaan, sekä Kaisi Kailan 1998 pro gradu -työn liitteiden 4 ja 5 avulla (Kaila: 1998: Liitteet 4 ja 5).

Katson itse valmiit lasit lävitse ja arvioin ne tiettyjen kriteerien mukaan (liite 3). Valmiin leikkeen kriteerit olen koostanut Kaisi Kailan 1998 pro gradu -työstä liitteestä 7.2 (Kaila 1998: Liite 7.2) sekä Labqualityn laaduntarkkailukierroksen, histologinen tekniikka 2000 (Labquality 2001), avulla. Patologit arvioivat lasit samoilla kriteereillä, sekä sen lisäksi muutamalla lisäkriteerillä (Kaila 1998: Liite 7.2) (liite 3).

Leikattaessa pyritään vakioimaan mahdollisimman moni asia. Käytännössä se tarkoittaa, että mikrotomin vedenvirtaus, veitsen kulma sekä leikepaksuus pyritään vakioimaan. Lämminvesihauteen lämpötila tarkastetaan ja leikkeiden oikaisuaika on kaikille leikkeille sama. Leikkeiden annetaan kuivua täysin kuiviksi, ennen kuin ne laitetaan lämpölevylle. Jokaisesta blokista tehdään kaksi 4 µm paksuista leikettä, jotka värjätään HE-menetelmällä värjäysautomaatilla. Vertaan valmiin kudisleikkeen kokoa blokissa olevaan kudospalaan, jolloin näen, onko kudos laajentunut leikkauksen yhteydessä ja mikroskopoin kaikki lasit. Tämän jälkeen patologit katsovat heille valitsemani lasit ja arvioivat ne samojen sekä muutamien lisäkriteerien mukaan (liite 3). Leikkautuvuutta arvioivia laboratoriohoitajia ja lopputulosta arvioivia patologeja on kaksi, jotta vertailusta tulisi luotettavampi, eikä se kuvastaisi vain yhden henkilön mielipidettä.

Työn vertailuosuus suoritettiin tammi–helmikuussa 2007, vertailusta saatava aineisto koostettiin ja analysoitiin helmi–maaliskuussa. Vertailulle haettiin lupa marraskuun lopulla ja lupa myönnettiin jo joulukuussa. Tarvittava teoreettinen materiaali kerättiin ja

koostettiin ennen tutkimuksen vertailuosan suoritusta. Materiaalin käsittely aloitettiin viikolla neljä ja valmiit lasit annettiin patologeille katsottaviksi viikolla seitsemän. Maaliskuussa koostin ja käsittelin tulokset, sekä kirjoitin puhtaaksi raportin tutkimuksen suorittamisesta, kuviossa neljä näkyvät työn eri vaiheet.



KUVIO 4. Tutkimuksen eteneminen kaaviokuvana

Tutkimusmenetelmäksi valitsin empiirisen, kuvailevan ja vertailevan tutkimuksen. Kuvaileva tutkimus on empiirisen selvityksen perusmuoto. Luotettavuus, yleistettävyys ja tarkkuus ovat tärkeitä kuvailevassa tutkimuksessa. Siksi kuvaileva tutkimus vaatii laajan aineiston, jolloin kuvaus on riittävän kattava. (Koivula – Suihko – Tyvärinen 2002: 17–22.) Tuloksen luotettavuuden kannalta on tärkeää, että otoskoko on riittävän suuri. Aineiston keruussa on apuna yleensä tutkimuslomake, jossa on valmiit vastausvaihtoehdot. Tilastoitu ja analysoitu materiaali voidaan havainnollistaa taulukoin ja kuvioin. (Heikkilä 2001: 16.)

Empiirisellä tutkimuksella pyritään saamaan vastaus tiettyihin esitettyihin tutkimusongelmiin. Tutkimus käyttää tilastotieteen todennäköisyysjakaumiin perustuvia menetelmiä hyväkseen. (Holopainen – Pulkkinen 1996: 8–9.) Tutkimuksen pohjana

käytetään teoriatietoa, jonka avulla pyritään selvittämään, toteutuuko teoriasta johdettu oletamus myös käytännössä. Tutkimuksella voidaan myös etsiä ratkaisu, kuinka jokin tietty asia tulisi toteuttaa. (Heikkilä 2001: 13.) Tutkimusta edeltää yleensä tutkimussuunnitelman teko. Lopuksi tutkimuksessa kerätyt tiedot analysoidaan ja tehdään raportti. Onnistunutta tutkimusta voidaan käyttää jatkossa hyväksi. (Holopainen – Pulkkinen 1996: 10.)

Suoritettavassa vertailussa koemuuttujina ovat pidempi kuduskäsittelyohjelma sekä kudospalan suurempi paksuus. Vertailussa käytettävät perusjoukot muodostuvat rinta- ja suolikudoksista, sekä iso- ja pikkuaivokudoksesta. Jos saatavilla on lipoomaa kudosten keräysajankohtana, liitetään se perusjoukkoon. Tutkimuksessa on kaksi arvioitavaa ja analysoitavaa vaihetta, jotka arvioidaan asteikoilla. Tulosten käsittely suoritetaan SPSS 14.0 tilastonkäsittelyohjelmalla.

6 VERTAILUN TOTEUTTAMINEN

Koska työn suorittamiseen on rajallinen aika, valittiin vertailuun sellaisia kudoksia, joita on mahdollista saada riittävästi lyhyessä ajassa. Patologit valitsivat vertailuun sopivan kudосmateriaalin siten, että kutakin kudosta tuli vähintään kaksi kappaletta. Lipooma otettiin tutkimukseen mukaan, sillä sitä oli sopivana ajankohtana saatavilla. Näin eri kudoksia oli viisi kappaletta, käsiteltäviä kudospaloja oli yhteensä 48 kappaletta (liite 4). Tutkimuksessa käytettävä välineistö ja tarvikkeet tulivat PHKS:n patologian laboratoriolta. Materiaalin hankinnassa huomioitiin, ettei se saa aiheuttaa vahinkoa potilaille tai heidän omaisilleen.

Tutkimuksesta kertyvä aineisto käsiteltiin tilastollisella menetelmällä, SPSS 14.0. Tutkimuslomakkeiden vastaukset syötettiin ohjelmaan ja analysoitiin käyttäen apuna aineiston jakoa ryhmiin. Tilastollisella käsittelyllä pyrittiin selvittämään, millaisia eroja saatiin kudosten leikkautuvuuteen ja leikkeen lopulliseen laatuun kahdella eri kuduskäsittelyohjelmalla. Lisäksi pyrittiin selvittämään kuduskappaleen paksuuden vaikutus kuduskuljetuksen onnistumiseen.

Olin tutustunut jo ennalta kuduskäsittelylaitteisiin, valamiseen, värjäysautomaattiin sekä

lasien päällystysautomaattiin. Aikaa ei siis kulunut laitteisiin tutustumiseen. Etsimme yhdessä ohjaajani kanssa vertailuun sopivia kudoksia, joista patologian osaston ylilääkäri valitsi vertailuun parhaiten sopivat kudokset. Ensimmäisellä viikolla saimme kaksi rinta- ja suolikudosta sekä yhdet iso- ja pikkuaivo- ja lipoomakudosnäytteet. Patologi leikkasi rinta ja suolikudoksista sekä lipoomasta vertailuun sopivat palat, toiseen rintakudokseen (kudos 4) tuli mukaan myös sidekudosta. Aivokudosta sain obduktiosta, patologi antoi palat iso- ja pikkuaivoja minulle, joista leikkasin itse vertailuun sopivat kudospalat. Aivokudokset olivat formaliinissa vähintään neljä päivää ennen leikkaamista ja kudostenkäsittelyautomaattiin laittoa. Ohuemmat kudospalat leikattiin mahdollisimman tarkkaan korkeintaan 3 mm paksuisiksi ja paksummat palat noin 5–6 mm paksuisiksi. Paksummat palat siis pursuilivat kudaskasettien koloista, kun niiden kannet suljettiin. Ohuempien palojen ja kuduskasetin kannen väliin jäi selkeä rako.

Toiseen kuljetukseen leikkasin yhdessä ohjaajani (laboratoriohoitaja) kanssa molempia aivokudoksia, suolta, rintaa ja lipoomaa. Koska mikrotomiavaiheessa ei edellisen kuljetuksen jälkeen ollut kovin suuria eroja, teimme paloista isommat leveys- ja pituussuunnassa. Ensimmäiseen kuljetukseen menneet palat olivat ohjekokoisia muilta mitoiltaan paitsi paksuudeltaan. Toiseen kuljetukseen menneet palat ovat enemmän potilasnäytteiden kokoluokkaa. Palojen leikkaamiseen käytimme mallina valmiita kudusblokkeja, jotta kudosten leveys ja pituusmitat vastaisivat keskimääräistä potilasnäytteen kokoa. Kudospalat täyttivät lähes koko kasetin pituus ja leveyssuunnassa. Lisäksi otimme rintakudoksen (kasetit 45–48) siten, että palassa on mukana ihoa, joka monesti aiheuttaa ongelmia mikrotomiavaiheessa. Suolikudokseen (kasetit 41–44), otimme suolen sisäpintaa (limakalvoa) mukaan. Lipooma leikattiin niin, että 3 mm paksut palat olivat ohjemittaisia (kasetit 49 ja 50), eli niille jäi liikkumatilaa kaikille puolille kasetin sisällä. 5 mm paksut palat täyttävät kasetin aivan täysin. Koska saatavilla ei ollut niin isoa lipoomaa (kudos 13), että täyttäminen olisi ollut mahdollista yhdellä palalla, on kaseteissa (kasetit 51 ja 52) kaksi palaa lipoomaa kummassakin. Kudos 10 (lipooma) jäi saamatta. Lipoomakudokset 9 ja 13 ovat samasta vatsan alueen lipoomasta. Ensimmäiseen ja toiseen kuljetukseen otetuissa paloissa ei ole selkeää tuumoria mukana, vaikka niin oli tarkoitus suoli- ja rintakudoksen kohdalla.

6.1 Arvioinnin kriteerit

Kudosten fiksaatio on oltava riittävää, eikä kudoksissa saa esiintyä liikaa kutistumista, vaan solumorfologia tulee olla hyvin säilynyt. Leikkeet tulee olla tasapaksuja, repeilemättömiä ja rypyttömiä. Leikkeissä ei saa esiintyä vierasmateriaalia tai leikkeen oma materiaali ei saa siirtyä väärään paikkaan (esim. punasolut). Lämpöhaudetta käytettäessä kudokse ei saa laajentua ja lämpölevyn aiheuttamaa tuma-artefaktaa ei saa esiintyä. (Päijät-Hämeen Keskussairaala, laatukäsikirja.) Hematoksyliini-eosiini-värjäyksessä tumavärin ja taustavärin välillä on oltava selvä kontrasti (Labquality 2001). Pienellä suurennuksella yksittäiset tumat nähtävä selkeästi, niissä ei saa esiintyä ruskehtavaa tai punertavaa sävyä. Suurella suurennoksella tuman kromatiini ja nukleoli ovat selkeästi erotettavissa, hematoksyliini ei saa aiheuttaa taustavärjäytymistä. Lihakudos, sidekudos, suuret elastiinisäikeet ja eosinofiiliset granulosyytit ovat värjäytyneet punaisen eri sävyihin eosiinilla (Päijät-Hämeen Keskussairaala, laatukäsikirja). Leikkeillä ei saa olla väritahroja ja väriliuosta tulee olla riittävästi värjäysmaljassa (Histologisen preparaatin laadunarviointikriteerejä).

Peitinlasin tulee olla riittävän kokoinen ja naarmuton. Valmiissa leikkeessä ei saa olla naarmuja tai puuttua osia. Peitinlasin kiinnitysainetta (optinen väliaine) ei saa olla liikaa, eikä se saa muuttaa leikkeen väriä. Väliaineeseen ei saa jäädä ilmakuplia. (Histologisen preparaatin laadunarviointikriteerejä.)

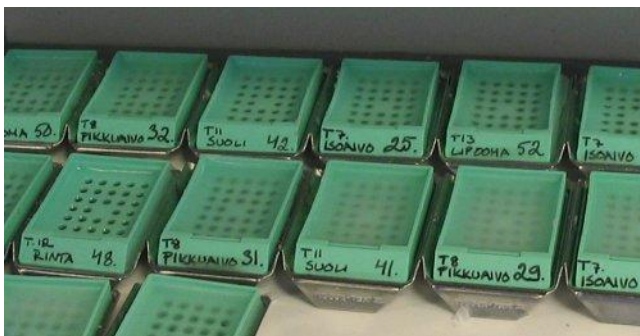
6.2 Kudoskuljetus, valu ja mikrotomia

Valitut kudokset ovat olleet fiksatiivissa selvästi pidempään kuin rutiininäytteet. Työssä ei kuitenkaan ole tarkoitus tutkia fiksaatioajan vaikutusta, joten fiksaatioaikaa ei vakioitu. Normaali kudoskuljetusohjelma ajettiin Shandon Exelsior™ ES: kudostenkäsittelyautomaatilla yhdessä tavallisten potilasnäytteiden kanssa. Normaali ohjelmassa menivät kasetit: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 33 ja 35. Rasvaohjelma ajettiin Shandon Exelsior™ kudostenkäsittelyautomaatilla. Rasvaohjelmaan menivät kasetit: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 34 ja 36. Näytteiden kuljetukset on esitetty tarkemmin liitteessä 4. Kuljetukset käynnistettiin ajastetusti viikonloppuna niin, että molemmat ohjelmat olivat valmiina maanantaiaamuna. Kuljetuksen päätyttyä kasetit säilytettiin sulassa parafiinissa ennen

valua. Toisessa kuljetuksessa normaaliohjelmaan menivät kasetit: 25, 27, 29, 31, 41, 43, 45, 47, 49, 51. Rasvaohjelmaan menivät kasetit: 26, 28, 30, 32, 42, 44, 46, 48, 50, 52. Kuljetukset ohjelmoitiin samoin kuin ensimmäisellä kerralla.

Formaliini, jota kudosten fiksaatioon ja kuljetukseen käytettiin, oli Reagenan valmistamaa. Liuos on kymmenprosenttista fosfaattipuskuroitua formaliinia, joka sisältää 4 % formaldehydiä. Liuoksen pH on 7.2. Kuljetuksissa ja myöhemmin värjäyksissä käytettävä ksyleeni on Oy FF-Chemicals Ab:n kemiallisesti puhdasta ksyleeniä, erä 071106. Absoloitu etanoli (kuljetukset ja värjäys) Bernerin valmistama, erä 13110132.

Näytteet valettiin leikkauspinta esilämmitetyn muotin pohjaa vasten parafiiniin, Tissue-Tek:in Tissue Embedding Console System parafiinivalukeskuksen avulla. Käytetty parafiini oli Algowax:in parafiinivahaseosta (parafiinipelletit, tuotenumero 900403), jonka sulamispiste on 56–58 °C. Sulan parafiinin lämpötila oli +61 °C. Kudospalojen asettelun apuna käytettiin lämmitettyjä atuloita, +70 °C. Valukeskukseen kuuluu kylmälevy, jolla



KUVIO 5. Näytteet valettu muotteihin.

valetut kudokset ja parafiini jäädytetään nopeasti. Kylmälevyn lämpötila oli -4 – -5 °C. Jähmettyneet blokit irrotettiin muoteista, kun ne olivat olleet kylmälevyllä vähintään 30 minuuttia jähmettymässä. Blokit siistittiin tarvittaessa.

Blokit laitettiin leikkauspisteessä olevalle kylmälevylle (CP-4 Kuntz Instruments), jonka lämpötila vaihteli -8 ja -9 °C välillä. Blokit olivat kylmälevyllä yli 30 minuuttia ennen mikrotomilla leikkuuta. Leikkaamiseen käytettiin Microm HM 355S rotaatiomallista vesiliukumikrotomia (kuvio 6 s. 25), jossa on lisävarusteena blokin jäähdytin (Cool Cut). Mikrotomissa käytettiin kertakäyttöistä veistä, joka vaihdettiin uuteen tarvittaessa. Objektilaseina käytettiin Menzel-Gläser SuperFrost-laseja, joiden koko on 76 x 26 mm. Mikrotomin vesihauteen lämpötila oli 36,5–37,5 °C. Varsinaisen suoristamiseen käytetyn vesihauteen lämpötila oli 46–47 °C. Käytetty vesihaude oli Axel Johansson Lab Systemin HIR-3 mallinen. Suoristukseen käytetty aika oli 5–10 s näytteestä riippuen. Pidempää suoristusaikaa ei tarvittu, sillä mikrotomin lämmin vesi

oikaisi leikkeitä. Mikrotomin vesipumpun voimakkuus oli 2,5–3. Mikrotomin veitsen kulma oli säädetty kohtaan 10. Lasit on eroteltu niin että ensimmäinen laboratoriohoitaja leikkasi valkoisille lasille ja toinen vihreille. Näin lasille voitiin merkitä vain blokkien juokseva numero. Leikkaaminen suoritettiin neljässä erässä muiden töiden ohella.

Blokkit trimmattiin 20 µm paksuisilla leikkeillä, niin että kudoksen koko pinta saatiin esiin. Varsinaiset leikkeet leikattiin 4 µm paksuisiksi. Ensimmäisen leikkuun jälkeen lähes kaikkien blokkien leikkautuvuus oli erinomainen. Toisen laboratoriohoitajan leikatessa blokkeja, päästiin syvemmälle kuduskappaleeseen, jolloin leikkautuvuus osittain huononi.



KUVIO 6. Leikkaamiseen käytetty mikrotomi Microm HM 355S.

6.3 HE värjäys, peittäminen ja mikroskopointi

Leikkeet valutettiin kuiviksi vähintään kaksi tuntia, osa leikkeistä sai kuivua yön yli, jos leikkaaminen suoritettiin iltapäivästä. Seuraavana päivänä leikkeet kiinnitettiin lasille lämpölevyllä, (Kunz HP-3) + 52 – +53 °C, 15 minuutin ajan. Lasit aseteltiin värjäysautomaatin kelkkoihin siten, että lasit olivat peräkkäisillä paikoilla. Kelkat täytettiin siis samoin kuin rutiinissakin.

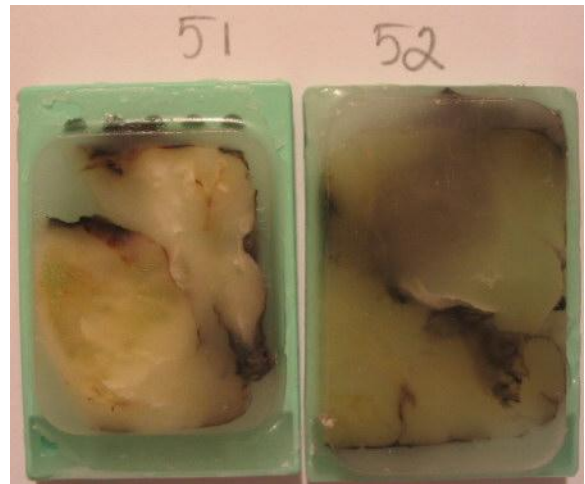
Leikkeet värjättiin värjäysautomaatilla, kuten rutiinissakin tehdään. Käytetty värjäysautomaatti oli Leica ST 5020. Kudokset värjättiin HE menetelmällä, menetelmän vaiheet ja liuokset esitetty tarkemmin liitteessä 5. Värjäyksessä käytettiin samoja kaupallisia liuoksia kuin potilasnäytteille.

Lasit päällystettiin värjäyksen jälkeen Sakuran Tissue-Tek® SCA peitinkalvoautomaatilla. Käytetty kalvomateriaali oli selluloosa triasetaattia ja hartsia. Kalvon alapinta on päällystetty aineella, joka reagoi ksyleenin kanssa ja kiinnittää siten

kalvon objektilasiin (Coverslipping film leveys 24 mm LOT 3260107). (Tissue-Tek[®]b.) peitinkalvoautomaatissa väliaineena toimii ksyleeni.

Katsoin kaikki lasit lävitse ensin itse ja arvioin ne liitteessä 3 olevilla kriteereillä. Aloitin lasien tarkastelun x10 suurennuksella, jolla tarkastelin kaikki kohdat, tarvittaessa katsoin vielä x20 suurennoksella kudismorfologian. Pystyäkseen arvioimaan värjäytymistä, katsoin ensin muutamia vanhoja potilasnäytteitä, jotka oli värjätty HE:lla. Vertasin siis värjäämiäni laseja rutiinissa tehtyihin laseihin.

Valitsin valmiista laseista syrjään ne, joissa ohjelmien erot näkyvät selkeimmin ja annoin ne patologeille tarkasteltaviksi. Koska kustakin blokista tehtiin kaksi leikettä, yksi valkealle ja yksi vihreälle lasille, jaoin rinnakkaiset lasit patologeille. Vaikka rinnakkaisissa laseissa vihreät on otettu syvemältä blokista, ei leikkeiden välillä ole niin suurta eroa, että lasien jako kuvatulla tavalla aiheuttaisi tulosten vääristymistä. Patologit arvioivat laseista leikkeen laadun, kudismorfologian säilymisen, värjäytymisen sekä tumien kromatiinin säilymisen. Kriteerit on esitetty liitteessä 3.



KUVIO 7. Vasemmalla raa'aksi jäänyt lipooma normaaliohjelmasta. Rinnalla rasavohjelman läpikäynyt blokki samasta lipoomasta.

7 TULOKSET

Vertailussa haettiin vastausta, vaikuttaako kudospalojen paksuus sekä erimittaiset kuduskuljetusohjelmat, kudosten leikkautuvuuteen ja lopullisten leikkeiden laatuun. Leikkautuvuus arvioitiin kaikista 48:sta blokista. Koska arvioivia laboratoriohoitajia oli kaksi, tuli lopullisen arvioidun joukon kooksi 96 kappaletta. Kaikista blokeista ei saatu leikettä lasille, joten valmiita laseja oli 93 kappaletta. Patologit (2) eivät katsoneet kaikkia laseja lävitse, vaan erikseen heille valitut lasit. Patologien vastaukset olivat

samansuuntaisia keskenään, arviointiin vaikutti kuitenkin patologioiden erilainen mieltymys värjäystuloksen eosiniin voimakkuuteen.

7.1 Kudoksen paksuuden ja kuduskuljetusohjelman vaikutus leikkautuvuuteen

Leikkautuvuuden kannalta ohjelmien välinen ero oli yllättävän vähäinen. Suurimmat erot näkyivät rinta- ja suolikudoksessa, jotka olivat lähes puhtaasti rasvaa. Aivokudosten leikkautuvuudessa ei ollut juurikaan eroja, mutta normaaliohjelman läpikäyneet aivokudosleikkeet laajenivat lämminvesihauteessa lähes poikkeuksetta (kuviot 8 s. 31). Rasvaohjelman läpikäyneet aivokudosleikkeet puolestaan pysyivät oikean kokoisina. Paksuista rinta- suoli- ja lipoomakudosblokeista näki jo leikatessa, ettei kuduskuljetus ollut onnistunut normaaliohjelmalla. Kudos oli keskeltä sameaa ja läpinäkymätöntä, eli raakaa (kuviot 7 s. 26). Raaka kohta hajosi jo leikattaessa ja tilalle jäi runsaasti reikiä. Edelleen lämminvesihauteessa kudos pyrki hajoamaan ja suoristukseen käytetty aika oli todella lyhyt. Rasvaohjelmassa olleet vastaavat paksut (5–6 mm) suoli-, rinta- ja lipoomakudokset leikkautuivat hyvin. Kuduskuljetuksen liuosajat olivat siis olleet riittävät ja kuljetus onnistunut. Kudospaloissa ei ollut raakoja alueita näkyvillä.

Laseja katsoessa, ei kudoksissa huomaa makroskooppisesti muuta eroa, kuin koon. Koon vaihtelu oli selkeintä molemmissa aivokudoksissa. Leikkeen pyykkilautamaista paksuusvaihtelua esiintyi vain yhdessä leikkeessä. Vaikka veistä ei vaihdettu uuteen jokaisen leikkeen välillä, löytyi vain muutamasta leikkeestä naarmuja. Laskostumista esiintyi paljon yhdessä leikkeessä ja vähän kolmessa leikkeessä. Yli 94 prosenttia leikkeistä leikkautui ilman laskostumista. Leikkeen reunojen irtoilu parafiinista oli vähäistä. Alle 10 prosentissa leikkeistä esiintyi irtoilua ja vain kahdessa leikkeessä irtoilua oli paljon. Eniten leikkeissä ilmeni repeilyä ja jonkin verran reikiintymistä.

Kaikki kudusblokit huomioiden, kudosten leikkautuvuus oli erinomainen. Taulukossa yksi (s. 28) on esitetty kaikkien kudosten leikkautuvuuden yleisarvioiden jakautuminen. Taulukossa ei ole huomioitu kudosten paksuuksia eikä ohjelmia.

TAULUKKO 1. Leikkautuvuuden yleisarvio kaikista kudoksista

Leikkautuvuus	Frekvenssi	Prosenttia
Huono	6	6,3
Kohtalainen	7	7,3
Hyvä	12	12,5
Erinomainen	71	74,0
Kaikki yhteensä	96	100,0

Vertailtaessa leikkautuvuutta kudospalojen paksuuteen nähden, voidaan selkeästi nähdä paksuuden vaikutus kudosten leikkautuvuuteen. Ohuemmat kudokkappaleet olivat paremmin leikkautuvia kuin paksummat kudokkappaleet. Ohuemmissa kudokkappaleissa ei ollut yhtään huonosti tai kohtalaisesti leikkautuvaa blokkia. Kudosten paksuuden aiheuttamat erot leikkautuvuuden kokonaisarvioon on esitetty taulukossa kaksi. Huonoimmat tulokset leikkautuvuuteen saatiin paksuille kudokkappaleille, jotka kuljetettiin normaaliohjelmalla. Ohuempien kudospalojen leikkautuvuudessa ei ollut eroa ohjelmien välillä. Kaikkien kudosten pyykkilautamainen poimuilu on esitetty liitteessä 7 ja laskostuminen liitteessä 8. Liitteessä 9 on esitetty kaikkien kudosten reunojen irtoilu parafiinista leikattaessa. Koska laskostumista, poimuilua ja reunojen irtoilua parafiinista esiintyi todella vähän, ei tuloksia esitellä erikseen eri kudosten kohdalla.

TAULUKKO 2. Blokkien leikkautuvuuden yleisarvio ohjelmien välillä

kudoksen paksuus	Käytetty kudokk.ohjelma	Leikkautuvuuden yleisarvio	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Hyvä	3	12,5
		Erinomainen	21	87,5
		Yhteensä	24	100,0
	Rasva	Hyvä	3	12,5
		Erinomainen	21	87,5
		Yhteensä	24	100,0
5-6 mm	Normaali	Huono	6	25,0
		Kohtalainen	7	29,2
		Hyvä	4	16,7
		Erinomainen	7	29,2
		Yhteensä	24	100,0
	Rasva	Hyvä	2	8,3
		Erinomainen	22	91,7
		Yhteensä	24	100,0

Kudoscappaleen paksuuden ja ohjelmien vaikutukset leikkeen repeilyyn, antoivat samansuuntaisen tuloksen kuin leikkautuvuuden yleisarvio. Taulukossa 3 on esitetty leikkeen repeily kudospaksuuksien ja kuduskuljetusohjelmien mukaan. Tuloksista voidaan selkeästi nähdä, että ohuemmat kudoscappaleet repeilevät vähemmän kuin paksut kudoscappaleet. Lisäksi paksujen kudoscappaleiden kohdalla tulee selkeä ero ohjelmien välille. Rasvaohjelman läpikäyneet paksut kudoscappaleet leikkautuvat keskimäärin vähemmän repeämin, kuin normaaliohjelman läpikäyneet paksut kudokset.

TAULUKKO 3. Leikkeen repeily mikrotomiassa

kudoksen paksuus	Käytetty kudosc.ohjelma	Repeily	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Kohtalaisesti	1	4,2
		Vähän	5	20,8
		Ei lainkaan	18	75,0
		Yhteensä	24	100,0
	Rasva	Kohtalaisesti	1	4,2
		Vähän	4	16,7
		Ei lainkaan	19	79,2
		Yhteensä	24	100,0
5-6 mm	Normaali	Erittäin paljon	4	16,7
		Paljon	5	20,8
		Kohtalaisesti	2	8,3
		Vähän	4	16,7
		Ei lainkaan	9	37,5
		Yhteensä	24	100,0
	Rasva	Vähän	5	20,8
		Ei lainkaan	19	79,2
		Yhteensä	24	100,0

7.1.1 Aivokudokset

Aivokudosten leikkautuvuus oli erinomainen (taulukko 4 s. 30). Pikkuaivoblokkit saivat kaikki erinomaisen yleisarvion leikkautuvuudelle, niin normaali- kuin rasvaohjelmallakin. Isoaivoista kaksi blokkia sai leikkautuvuudesta arvion hyvä, yksi rasva- ja yksi normaaliohjelmasta. Loput isoaivoblokkit saivat erinomaisen arvion leikkautuvuudesta. Trimmauksessa esiintyi vähän sälöilyä tai repeilyä. Edustavien leikkeiden teko onnistui helposti, eivätkä ohjelmien väliset erot tulleet mikrotomiassa esille.

TAULUKKO 4. Aivokudosten leikkautuvuuden yleisarvio

kudoksen paksuus	Käytetty kudost.ohjelma	Kudos	Leikkautuvuuden yleisarvio	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Isoaivo	Erinomainen	4	100,0
		Pikkuaivo	Erinomainen	4	100,0
	Rasva	Isoaivo	Hyvä	1	25,0
			Erinomainen	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
5-6 mm	Normaali	Isoaivo	Hyvä	1	25,0
			Erinomainen	3	75,0
	Rasva		Yhteensä	4	100,0
		Pikkuaivo	Erinomainen	4	100,0
			Erinomainen	4	100,0

Leikkeisiin tulleet makroskooppiset repeämät olivat vähäisiä ja niitä esiintyi vain osassa leikkeitä. Kohtalaisesti repeämiä oli yhdessä isoaivokudosleikkeessä ja vähän neljässä leikkeessä. Täysin repeilemättömiä leikkeitä oli 11 kappaletta. Pikkuaivokudosleikkeistä 13 oli täysin ehjiä ja kolmessa leikkeessä oli vähän repeilyä. Leikkeissä ei esiintynyt reikiintymistä. Taulukossa viisi (Taulukko 5 s. 31) on esitetty normaali ja rasvaohjelmien väliset erot leikkeiden repeilyssä. Leikkeistä yksikään ei reikiintynyt leikattaessa tai hajonnut vesihauteessa. Aivokudosleikkeiden koko verrattuna blokissa oleviin kudospaloihin, antoi selkeän eron normaali- ja rasvaohjelman välille. Normaali-ohjelman läpikäyneet kudokset olivat selkeästi laajentuneet, kun taas rasvaohjelman läpikäyneet kudokset pysyivät oikean kokoisina (kuvio 8). Kaikista aivokudusblokeista saatiin leikkeet.



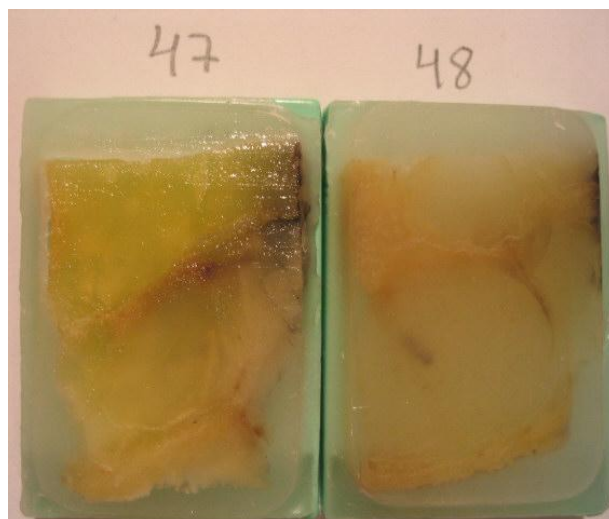
KUVIO 8. Aivokudosleikkeen koko verrattuna blokissa olevan kudospaloihin kokoon. Vasemmalla leike selkeästi laajentunut blokkiin verrattuna.

TAULUKKO 5. Aivokudoksen repeily mikrotomiassa

kudoksen paksuus	Käytetty kudostk.ohjelma	Kudos	Repeily	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Isoaivo	Vähän	2	50,0
			Ei lainkaan	2	50,0
			Yhteensä	4	100,0
		Pikkuaivo	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
	Rasva	Isoaivo	Kohtalaisesti	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
		Pikkuaivo	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
5-6 mm	Normaali	Isoaivo	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
		Pikkuaivo	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
	Rasva	Isoaivo	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
		Pikkuaivo	Ei lainkaan	4	100,0

7.1.2 Rinta- ja suolikudos

Rintakudoksissa saatiin selkeä ero normaali- ja rasvaohjelmalle. Normaali-ohjelman liuosajat eivät olleet läheskään riittävät paksuille näytteille. Jo valettaessa, kudoksista huomasi niiden olevan sameita ja läpinäkymättömiä (raakoja). Raaka kudos oli valmiissa blokissa painunut kuopalle. Kasetti 47, joka oli täytetty reunasta reunaan ja pohjasta kanteen aivan täyteen, aiheutti valettuna blokkina leikkaajille ongelmia. Kudos oli aivan raakaa ja leikkauspinta suorastaan tihkui rasvaa (kuvio 9), blokista 47 ei saatu leikettä. Leike hajosi virtaavaan veteen niin pieniksi murusiksi, ettei edes osaa leikkeestä voitu ottaa arviointiin



KUVIO 9. Kuvassa näkyy normaali- ja rasvaohjelmassaolleiden kudosten ero. Blokki 47 on aivan samea ja raaka.

mukaan. Blokin 47 vertailublokki 48, joka oli kuljetettu rasvaohjelmalla, oli leikkautuvuudeltaan erinomainen. Erityyppisten kudosten saumakohdat eivät aiheuttaneet blokissa 48 ongelmia leikkaamiseen. Myös muissa rinnakkaisissa rintakudosblokeissa saatiin vastaavia eroja, joskaan erot eivät olleet aivan niin suuret. Normaali ohjelmassa kuljetetut rintakudokskappaleet säilöivät tai hajosivat trimmattaessa. Rasvaohjelmassa kuljetetut rintakudokskappaleet eivät säilöilleet tai hajonneet trimmattaessa.

Suolikudospaloissa tulokset olivat vastaavanlaisia, kuin rintakudoksella. Ohuissa kudokskappaleissa ei ollut eroa ohjelmien välillä mikrotomiassa. Paksuissa kudokskappaleissa erot korostuivat, kun kudokso oli jäänyt raa'aksi keskeltä. Suolikudoksista saatiin kuitenkin kaikista leikkeet. Paksuissa kudokskappaleissa ei saatu yhtään erinomaisesti leikkautuvaa kudosblokkia normaali ohjelmalla, kun taas rasvaohjelmalla suurin osa oli erinomaisesti leikkautuvia (taulukko 6 s. 33).

Rinta- ja suolikudoksen repeilyä esiintyi eniten paksuissa kudokskappaleissa, jotka oli kuljetettu normaali ohjelmalla. Ohuiden kudokskappaleiden välillä ei ollut mainittavia eroja ohjelmien välillä. 5–6 mm paksuisista rintakudokskappaleista, jotka oli kuljetettu normaali ohjelmalla, ei yksikään kuudesta blokista leikkautunut ilman repeilyä tai reikiintymistä. Kahdessa blokissa esiintyi vähän, kahdessa kohtalaisesti ja kahdessa paljon repeilyä. Rinnakkaiset kudokskappaleet, jotka oli kuljetettu rasvaohjelmalla, repeilivät vähemmän. Kolmessa blokissa ei esiintynyt lainkaan repeilyä ja kolmessa vain vähän. Paksuissa suolikudokskappaleissa ero oli hieman pienempi. Normaali ohjelmalla kuljetetuista paksuista kudokskappaleista repeili paljon kolme blokkia, kohtalaisesti yksi blokki ja täysin repeilemättä yksi blokki. Yksikään kuudesta rinnakkaisesta paksusta suolikudokskappaleesta, jotka oli kuljetettu rasvaohjelmalla, ei repeillyt leikattaessa. Leikkeiden reikiintymisessä tulokset olivat samansuuntaiset kuin repeilyn kohdalla. Repeilystä ja reikiintymisestä on esitetty taulukot liitteessä kuusi (liite 6). Rinta- ja suolikudoksista osa hajosi vesihautauksessa. 2–3 mm kudokskappaleiden välillä ei ollut mainittavia eroja, kun taas paksumpien kudokskappaleiden välillä hajoamista tapahtui enemmän normaali ohjelmalla kuljetetuissa rinta- ja suolikudoksissa, kuin rasvaohjelmalla kuljetetuissa kudoksissa.

TAULUKKO 6. Rinta- ja suolikudoksen leikkautuvuuden yleisarvio mikrotomiassa.

kudoksen paksuus	Käytetty kudost.ohjelma	Kudos	Leikkautuvuuden yleisarvio	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Suoli	Hyvä	1	16,7
			Erinomainen	5	83,3
			Total	6	100,0
		Rinta	Hyvä	2	33,3
			Erinomainen	4	66,7
			Yhteensä	6	100,0
	Rasva	Suoli	Hyvä	1	16,7
			Erinomainen	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
		Rinta	Hyvä	1	16,7
			Erinomainen	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
5-6 mm	Normaali	Suoli	Huono	2	33,3
			Kohtalainen	2	33,3
			Hyvä	2	33,3
		Rinta	Yhteensä	6	100,0
			Huono	2	33,3
			Kohtalainen	4	66,7
	Rasva	Suoli	Yhteensä	6	100,0
			Erinomainen	6	100,0
		Rinta	Hyvä	2	33,3
			Erinomainen	4	66,7
			Yhteensä	6	100,0
		Suoli	Yhteensä	6	100,0

Rinta- ja suolikudosleikkeiden kokoa verrattuna blokissa olevaan kudokskappaleen kokoon, oli erittäin hankalaa verrata. Leikkeet olivat lähes puhtaasti rasvaa, jolloin valmis värjätty leike tuskin erottui lasilta makroskooppisesti. Leikkeet joissa oli mukana sidekudosta, ihoa tai suolen limakalvoa, olivat suurimmaksi osaksi samankokoisia kuin blokissa olevat kudokskappaleet. Yhdessä normaali-ohjelmalla kuljetetussa 5–6 mm paksussa rintakudokskappaleessa esiintyi pyykkilautamaista poimuilua leikattaessa. Laskostumista esiintyi yhdessä 2–3 mm paksuisessa rintakudokskappaleessa ja kahdessa 5–6 mm paksuisessa rintakudokskappaleessa.

7.1.3 Lipooma

Kaikki kahdeksan 2–3 mm paksuista lipoomakudokskappaletta leikkautui yleisarvioltaan erinomaisesti. Ohjelmien välillä ei todettu leikkautuvuudessa yleisesti eroa. 5–6 mm lipoomakudokskappaleista normaali-ohjelmalla kuljetetuista neljästä lipoomakudoksesta, yksikään ei leikkautunut erinomaisesti. Kaksi blokkia leikkautui huonosti, yksi

kohtalaisesti ja yksi hyvin. Rinnakkaiset kudoscappaleet, jotka kuljetettiin rasvaohjelmalla, leikkautuivat kaikki erinomaisesti.

Repeilyä ja reikiintymistä esiintyi leikattaessa lähinnä 5–6 mm paksuissa lipoomakudoscappaleissa, jotka oli kuljetettu normaaliohjelmalla. Leikkeiden hajoamista vesihauteessa esiintyi vain 5–6 mm paksuissa, normaaliohjelmalla kuljetetuissa lipoomakudoscappaleissa (taulukko 7).

TAULUKKO 7. Lipoomaleikkeiden hajoaminen vesihauteessa

kudoksen paksuus	Käytetty kudosc.ohjelma	Kudos	Leikkeen hajoaminen vesihauteessa	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Lipooma	Ei lainkaan	4	100,0
		Isoaivo	Ei lainkaan	4	100,0
		Lipooma	Ei lainkaan	4	100,0
5-6 mm	Normaali	Lipooma	Erittäin paljon	1	25,0
			Paljon	1	25,0
			Kohtalaisesti	1	25,0
			Vähän	1	25,0
			Yhteensä	4	100,0
	Rasva	Lipooma	Ei lainkaan	4	100,0

Kudoscappaleiden leikkautuvuudessa ei voitu todeta eroja ohjelmien välillä, kudospalojen paksuuden ollessa 2–3 mm. Paksummissa kudoscappaleissa ero leikkautuvuudessa oli selkeä. Yksi 5–6 mm paksuinen normaaliohjelmalla kuljetettu lipoomablokki (blokki 51) oli niin huonosti leikkautuva, ettei siitä saatu kuin yksi leike arvioitavaksi.

7.2 Lopullisten leikkeiden laatu

Valitsin patologeille tarkasteltaviksi osan laseista. Valinnan perustana käytin omia arvioitani leikkeiden laadusta. Halusin kaikista kudoksista vähintään yhden sarjan, eli 4 lasia, katsottavaksi. Suoli- ja rintakudoksesta valitsin kuitenkin kaksi sarjaa kummastakin, sillä niissä ohjelmien väliset erot olivat jo mikrotomiavaiheessa suurimmat. Katsottavia laseja tuli yhteensä 27 kappaletta. Blokista 47 ei saatu leikettä lasille, joten kyseistä rintakudospalaa ei voitu arvioida mikroskooppisesti.

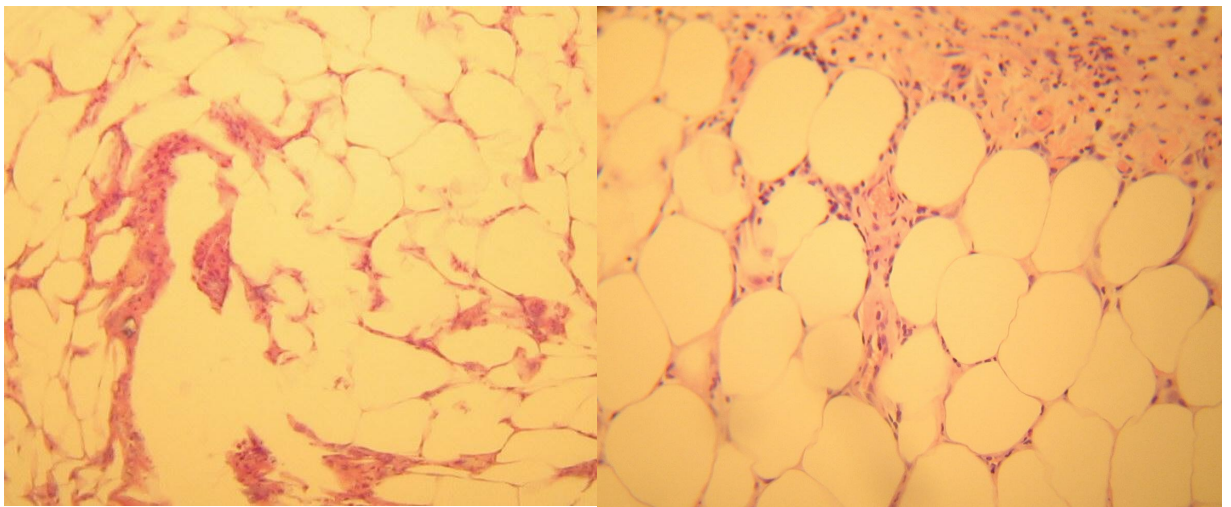
Leikkeen laadun kokonaisarvio oli parempi rasvaohjelman läpikäyneillä kudoksilla kuin normaaliohjelmassa kuljetetuilla kudoksilla (taulukko 8, kuvio 9 s. 35). Samoin kuin

mikrotomiavaiheessa, valmiissa leikkeissäkin erot ovat selkeimmillään paksujen kuduskappaleiden kohdalla.

TAULUKKO 8. Patologien arvio leikkeiden laadusta kokonaisuutena.

Kudoksen paksuus	Käytetty ohjelma		Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	tydyttävä	3	21,4
		hyvä	11	78,6
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	tydyttävä	1	7,1
		hyvä	13	92,9
		Yhteensä	14	100,0
5-6 mm	Normaali	Huono	1	7,1
		Välttävä	1	7,1
		tydyttävä	8	57,1
		hyvä	2	14,3
		Yhteensä	12	85,7
		Puuttuu	2	14,3
	Rasva	Yhteensä	14	100,0
		tydyttävä	4	28,6
		hyvä	10	71,4
		Yhteensä	14	100,0

Kudosmorfologian kokonaisarvio oli parempi rasvaohjelman läpikäyneillä kudoksilla (kuvio 10). Ero oli selkeä varsinkin paksummissa kuduskappaleissa. Värjäytymisen kokonaisarvio oli yhtä lasia lukuun ottamatta hyvä. Tumien kromatiinin säilymisen kokonaisarvio oli paras ohuilla kuduskappaleilla, jotka oli kuljetettu rasvaohjelmalla. Paksuissa kuduskappaleissa oli ohjelmien välillä selkeä ero rasvaohjelman eduksi. Taulukot liitteessä 10.



KUVIO 10. Vasemmalla normaaliohjelman ja oikealla rasvaohjelman läpikäyneet leikkeet. Kuvissa kaseteista 23 ja 24 suolikudosta.

7.2.1 Leikkeen laatu

Normaali- ja rasvaohjelmalla kuljetetut 2–3 mm paksuiset kudospalat olivat valmiina leikkeinä lähes saman tasoisia reikiintymisen osalta. 5–6 mm paksuisissa kudospaloissa rasvaohjelman läpikäyneet kudokset reikiintyivät selkeästi vähemmän, kuin rinnakkaiset normaaliohjelman läpikäyneet kudokset. Normaaliohjelmalla kuljetetuista 5–6 mm paksuisista (n=12) vain seitsemän leikettä oli reikiintymättömiä, muissa oli reikiä kohtalaisesti (2) tai vähän (3). Blokista 47 ei saatu leikkeitä lainkaan, joten kaksi lasia jäi arvioimatta.

Leikkeen ryppyisyydessä ei ollut eroja 2–3 mm paksuisissa kudoksissa. Yhdessä leikkeessä esiintyi kummallakin ohjelmalla vähän ryppejä (n=12). 5–6 mm paksuisissa kudoksissa ryppyisyyttä oli useammassa normaaliohjelman läpikäyneessä leikkeessä (n=12). Kohtalaisesti ryppejä oli kahdessa leikkeessä ja vähän kolmessa leikkeessä. Täysin rypyttömiä leikkeitä oli seitsemän. Rasvaohjelmalla kuljetetuissa 5–6 mm leikkeissä (n=14) ryppejä oli kohtalaisesti yhdessä ja vähän yhdessä leikkeessä. Täysin rypyttömiä leikkeitä oli 12 kappaletta.

Naarmuisuutta esiintyi kaikissa ryhmissä muutamalla lasilla. 5–6 mm normaaliohjelmalla kuljetetuissa naarmuisuuden määrä oli kohtalaista ja sitä esiintyi kahdella lasilla (n=12). 2–3 mm normaaliohjelmalla kuljetetuista kahdessa leikkeessä esiintyi naarmuja vähän (n=14) ja rasvaohjelmalla kuljetetuista vain yhdessä. 5–6 mm rasvaohjelmalla kuljetetuissa kudoksissa naarmuja esiintyi yhdessä leikkeessä kohtalaisesti.

Leikkeen repeilyn välillä ei ollut juurikaan eroa 2–3 mm paksuisissa kudoksissa. Normaaliohjelmalla kuljetetuista neljässä (n=14) esiintyi vähän repeilyä ja rasvaohjelmalla kuljetetuissa repeilyä esiintyi kolmessa leikkeessä vähän (n=14). 5–6 mm paksuisista kudoksista, jotka oli kuljetettu normaaliohjelmalla, vain kaksi oli repeilemättömiä (n=12). Rasvaohjelmalla kuljetetuista 5–6 mm paksuisista kudoksista saatiin 12 leikettä joissa ei esiintynyt repeilyä lainkaan ja kaksi joissa repeilyä esiintyi vähän (n=14). Kaikissa kudostyypeissä repeilyä esiintyi eniten kudosten saumakohdissa, esim. rasvakudoksen ja sidekudoksen rajalla.

Leikkeen irtoilua lasilta ei esiintynyt 2–3 mm paksuisissa kudoksissa lainkaan. 5–6 mm

paksuisissa irtoilua esiintyi normaaliohjelmalla kuljetetuissa kohtalaisesti neljässä leikkeessä (n=12) ja rasvaohjelmalla kuljetetuissa vähän yhdessä leikkeessä (n=14).

Leikkeiden paksuusvaihtelua esiintyi vain 5–6 mm paksuisissa kudoksissa. Normaaliohjelmalla kuljetetuista kahdessa leikkeessä paksuusvaihtelua esiintyi vähän (n=12) ja rasvaohjelmalla kuljetetuissa yhdessä leikkeessä vähän (n=14). Toinen patologeista antoi palautteen, että osa rasvakudosleikkeistä oli jopa liian ohuita, jolloin värjäystulos oli todella haalea.

5–6 mm paksuisissa kudoksissa leikkeen laatu oli kauttaaltaan parempi, jos kudos oli käsitelty rasvaohjelmalla. 2–3 mm paksuisissa kudoksissa ohjelmien väliset erot olivat melko pieniä.

7.2.2 Kudosmorfologian säilyminen

2-3 mm paksuisissa kudoksissa vain yhdessä normaaliohjelmalla kuljetetussa leikkeessä yksittäisten solujen erottuminen oli kohtalaista (n=14). Kaikissa muissa leikkeissä yksittäiset solut erottuivat hyvin. 5–6 mm paksuisissa kudoksissa normaaliohjelmalla kuljetetuista kudoksista kuudessa leikkeessä (n=12) yksittäisten solujen erottuminen oli kohtalaista, loppuissa kuudessa leikkeessä solut erottuivat hyvin. Rasvaohjelmalla kuljetetuista 5–6 mm paksuisista kudoksista tehdyissä leikkeissä kaikissa yksittäiset solut erottuivat hyvin (n=14).

2–3 mm paksuisissa kudoksissa vain yhdessä normaaliohjelmalla kuljetetussa leikkeessä tumien erottuminen oli kohtalaista (n=14). Kaikissa muissa leikkeissä tumat erottuivat hyvin. 5–6 mm paksuisissa kudoksissa normaaliohjelmalla kuljetetuista kudoksista kuudessa leikkeessä (n=12) tumien erottuminen oli kohtalaista ja yhdellä leikkeellä vähäistä, loppuissa viidessä leikkeessä tumat erottuivat hyvin. Rasvaohjelmalla kuljetetuista 5–6 mm paksuisista kudoksista tehdyissä leikkeissä tumat erottuivat kohtalaisesti kahdessa leikkeessä ja hyvin 12 leikkeessä (n=14).

Kudosmorfologia säilyi 5–6 mm paksuisissa kudoksissa paremmin, kun ne kuljetettiin rasvaohjelmalla. 2–3 mm paksuisissa kudospaloissa ohjelmien välinen ero oli kudosmorfologian kannalta erittäin pieni.

7.2.3 Värjäytyminen

Tumavärin voimakkuus oli 2–3 mm paksuisissa kudoksissa hyvä 13 leikkeessä (n=14) sekä normaali- että rasvaohjelmalla kuljetetuissa. 5–6 mm paksuisissa kudoksissa tumaväri oli hyvä 11 normaaliohjelmalla kuljetetuissa (n=12) ja kaikissa rasvaohjelmalla kuljetetuissa kudoksissa (n=14). Kaikista patologioiden katsomista laseista vain kolmessa tumavärin voimakkuus oli kohtalainen.

Eosiinin voimakkuus oli normaaliohjelmalla kuljetetuissa 2–3 mm paksuisissa kudoksissa 12 hyvä (n=14), kohtalainen yhdessä ja tulkittavissa oleva yhdessä. Rasvaohjelmalla kuljetetuissa 2–3 mm kudoksissa eosiinin voimakkuus oli hyvä 12 leikkeessä (n=14) ja kohtalainen kahdessa leikkeessä. 5–6 mm paksuisista kudoksista normaaliohjelmalla kuljetetuista kudoksista 10:ssä leikkeessä eosiinin voimakkuus oli hyvä (n=12) ja kahdessa kohtalainen. Rasvaohjelmalla kuljetetuissa eosiinin voimakkuus oli hyvä 13:ssä leikkeessä ja kohtalainen yhdessä (n=14). Eosiinin voimakkuuden arviointiin vaikutti suuresti, kuinka punaiseen lopputulokseen patologi on tottunut. Pelkkää rasvakudosta olevat leikkeet hankaloittivat osaltaan eosiinin voimakkuuden arviointia. Jos kudoksessa oli mukana muuta solukkoa oli eosiinin voimakkuus helpompi arvioida.

Tumavärin ja eosiinin kontrasti oli hyvä suurimmassa osassa leikkeitä. 2–3 mm paksuisissa kudoksissa kontrasti oli hyvä 13:ssä leikkeessä (n=14) ja kohtalainen yhdessä. Rasvaohjelmalla kuljetetuista 2–3 mm kudoksista 12:ssä leikkeessä kontrasti oli hyvä ja kahdessa kohtalainen. 5–6 mm normaaliohjelmalla kuljetetuissa kudoksissa kontrasti oli kohtalainen kahdessa leikkeessä ja hyvä 10:ssä leikkeessä (n=12). Rasvaohjelmalla kuljetetuissa kontrasti oli kohtalainen kahdessa ja hyvä 12:ssä leikkeessä (n=14). Ohjelmilla ei ollut eroa tumavärin ja eosiinin kontrastiin.

Pääosin kaikki lasit olivat värjäytyneet hyvin ja eri kudskomponentit olivat tulkittavissa.

7.2.4 Kromatiinin säilyminen tumissa

2–3 mm paksuisissa kudoksissa vain yhdessä normaaliohjelmalla kuljetetuissa

kromatiinin säilyminen oli kohtalaista ja kaikissa loppuissa hyvin (n=14). Rasvaohjelmalla kuljetetuissa kromatiini oli säilynyt hyvin kaikissa kudoksissa. 5–6 mm paksuisissa kudoksissa, jotka oli kuljetettu normaaliohjelmalla, viidessä leikkeessä kromatiinin säilyminen oli kohtalaista ja seitsemässä kromatiini oli säilynyt hyvin (n=12). Rasvaohjelmalla kuljetetuista kromatiinin säilyminen oli kolmessa leikkeessä kohtalaista ja 11:ssä hyvä (n=14).

Tumien kromatiini oli tasaisesti jakautunutta kaikissa paitsi yhdessä 2–3 mm paksuisissa kudoksissa. 5–6 mm paksuisissa kudoksissa normaaliohjelmalla kuljetetuista vain viidessä leikkeessä kromatiinin jakautuminen oli tasaista. Kohtalaisen tasaista se oli kuudessa leikkeessä ja vain vähän tasaisesti jakautunutta yhdessä leikkeessä (n=12). Rasvaohjelmalla kuljetetuista kolmessa kromatiinin jakautuminen oli kohtalaista ja loppuissa 11:ssä leikkeessä kromatiini oli jakautunut tasaisesti.

Tumajyvysten erottumisessa ei ollut ohjelmien välistä eroa 2–3 mm paksuisissa kudoksissa. Tumajyvät erottuivat yli 90 prosentista leikkeitä. 5–6 mm paksuisista kudoksista yhdessä normaaliohjelmalla kuljetetuista kudoksista tumajyviä ei erottunut lainkaan. Kohtalaisesti tumajyviä erottui kolmessa leikkeessä (n=12) ja paljon erottui kahdeksassa leikkeessä. Rasvaohjelmalla kuljetetuista tumajyviä erottui kohtalaisesti kolmessa leikkeessä ja paljon 11:ssä (n=14).

Tumien värjäytyminen oli pääosin selkeää. 2–3 mm paksuisista kudoksista kaikissa yhtä lukuun ottamatta tumat olivat värjäytyneet hyvin. 5–6 mm paksuisissa ohjelmien välillä oli selkeä ero. Normaaliohjelmalla kuljetetuista kudoksista kuudessa leikkeessä tumien värjäytyminen oli hyvä ja kuudessa kohtalainen (n=12). Rasvaohjelmalla kuljetetuista kudoksista tumien värjäytyminen oli hyvä 12:ssa ja kohtalainen kahdessa leikkeessä (n=14).

8 JOHTOPÄÄTÖKSET JA VERTAILUN LUOTETTAVUUS

Kudoskuljetuksessa kudoksesta poistetaan vesi ja imeytetään kudokseen parafiini. Alkoholit liuottavat rasvaa, joten rasvakudos näkyy mikroskoopissa kalanverkkomaisena. Liian lyhyissä liuosajoissa rasva ei oletettavasti ehdi liueta

kudoksesta pois, jolloin se ei korvaudu parafiinilla. Paksuissa kudospaloissa liuosten vaihto ei oletettavasti pääse kunnolla tapahtumaan, sillä kudoksesta painuu tiiviisti kasettia vasten pienentäen samalla huomattavasti liuosten vaihto pinta-alaa. Huonosti käsitelty raaka kudoksesta muhentuu leikattaessa ja rasva leviää vesihauteen pintaan leikettä oikaistaessa. Raakakudokset likaavat onnistuneesti kuljetettuja kudoksia herkemmin mikrotomit ja vesihauteet aiheuttaen näin suurentuneen kontaminaatiovaaran.

Rinnakkaisten leikkeiden erot olivat lähes samanlaisia eri tapausten välillä. Myös kudosten välisiä eroja ilmeni. Aivokudos on tiivistä ja sisältää paljon rasvaa ja vettä, silti se leikkautui lähes poikkeuksetta hyvin. Lipooma, joka on puhdasta rasvakudosta, ei osoittautunut niin hankalaksi kuin rinta- ja suolikudos. Mikroskooppisesti katsottuna erityyppisten kudosten saumakohdat ovat herkimpiä repeilylle. Rasva- ja sidekudoksen rajalla esiintyi lähes poikkeuksetta jonkin asteista repeilyä.

Vertailussa saadut tulokset tukevat rasvaohjelman käyttöönottoa rutiiniin normaaliohjelman rinnalle. Aivokudoksille rasvaohjelmasta oli hyötyä lähinnä vesihauteessa laajentumisen ehkäisemiseksi. Suoli-, rinta- ja lipoomakudoksille, joiden paksuus oli 5–6 mm, rasvaohjelman käytön etu oli selkeä. Rasvaohjelman käyttöä tuki sekä mikrotomiavaiheen että mikroskopiointivaiheen arvioinnit.

Vertailun luotettavuutta lisää se, että sekä mikrotomiavaiheessa (96 blokkia) että valmiiden lasien arviointivaiheessa arvioijia oli kaksi. Leikkaajat tiesivät mitä kudoksia leikkaavat, mutta eivät niiden paksuutta tai käytettyä kuduskuljetusohjelmaa. Patologit saivat numeroidut lasit (27 kpl), eivät mitään muita esitietoja katsottavista leikkeistä. Näin arvioijat eivät voineet vaikuttaa tuloksiin tietoisesti. Katsottu lasimäärä on kohtalaisen pieni, joten tuloksia ei voida yleistää yhtä luotettavasti, kuin mikrotomian osalta. Toinen patologi arvioi valmiiden lasien tason kauttaaltaan erittäin hyväksi.

Vertailussa käytetty kudospateriaali oli kauttaaltaan fiksoitunutta, joten riittämätön fiksaatioaika ei vaikuttanut tulosten luotettavuuteen. Kaikissa työvaiheissa noudatettiin huolellisuutta ja tarkkuutta, näin ollen riski kudosten sekaantumisesta keskenään, on olematon. Histologisen kudoksenäytteen valmistaminen on monivaiheinen prosessi. Kaikki työvaiheet tehtiin ohjeistuksen mukaisesti, jolloin tulos on normaaliin potilasnäyte työskentelyyn rinnastettavissa.

Arvioinnissa käytetyt kriteerit olivat riittävät, joiltakin osin jopa liian laajat. Mikrotomiavaiheessa leikkautuvuutta arvioitiin kuudessa kohdassa, joista muutamaa ei esiintynyt lainkaan tai vain yhdessä leikkeessä. Kirjasin itse laboratoriohoitajien ja toisen patologin arvoinnit, joten lomakkeiden täyttämässä vältettiin väärinymmärrykset. Arvioijat olivat kaikki alansa ammattilaisia.

Sekä leikkautuvuutta että lopullisten lasien laatua vertailtaessa, käytettiin kaikkea saatua arviointimateriaalia. Toisin sanoen vertailun tulokset ovat kahden laboratoriohoitajan sekä kahden patologin arviointien keskiarvoja. Patologiin arviointeja ei ollut syytä erottaa toisistaan, sillä ne olivat pääpiirteiltään toisiaan vastaavia. Suurimmat erot patologien arvioinneissa koskivat eosinoin voimakkuutta. Työssä ei kuitenkaan ollut tarkoitus puuttua yksittäisen värisävyn voimakkuuden arviointiin, joten tulkituin eron johtuvan patologien mieltymyksestä ja tottumuksesta tietynlaiseen värisävyyn.

Vertailussa pyrittiin selvittämään kahden kuduskuljetusohjelman eroja, käytettäessä eripaksuisia kudoksia. Vertailusta saadut tulokset vastaavat esitettyihin tutkimusongelmiin.

9 POHDINTA

Vertailun suorittaminen oli ajankohtaista nykyisten laatuvaatimusten vuoksi. Kuduskuljetusohjelmat olivat molemmat jo käytössä aloittaessani vertailun. Potilasnäytteet kuljetettiin pääsääntöisesti normaali ohjelmalla, yksittäisiä rasvanäytteitä saatettiin kuljettaa rasvaohjelmalla. Rasvaohjelman käyttö potilasnäytteille on siis ollut sattumanvaraista. Vertailusta saamani tulokset kuitenkin osoittavat rasvaohjelman edut. Näytteiden valmistus leikkeiksi ja diagnoosi viivästyvät rasvaohjelmaa käytettäessä muutamia päiviä, mutta ohjelman käyttö helpottaa ja nopeuttaa mikrotomiavaihetta.

Tarve vertailun suorittamiselle lähti nimenomaan mikrotomiavaiheen ongelmista. Raaka ja pehmeä kudos ei leikkaannu hyvin ja hajoaa vesihautteella. Leikkeellä raaka kohta näkyy usein tyhjänä alueena, vaikeimmissa tapauksissa lasille saadaan lähinnä kudospalaa ympäröivä parafiini.

Työn laajuus oli sopiva ja rajausta onnistunut. Teoriapuolella oli joillain alueilla vaikeaa rajata tieto oleelliseen ja karsia epäoleellinen pois. Saamani ohjaus oli asiantuntevaa ja tuki työskentelyäni kaikissa vaiheissa. Vertailun suorittaminen oli mielenkiintoista ja opettavaista. Työssä syvennyttiin patologian laboratorion keskeiseen aiheeseen. Teoreettisen tiedon haku ja koostaminen antoivat hyvät tiedot histologisen näytteen valmistuksen eri vaiheista. Riippumatta siitä minkä alan laboratoriossa jatkossa työskentelen, uskon voivani hyödyntää työstä oppimaani asiaa.

Työni tuloksia voidaan varmasti käyttää hyödyksi laboratorioissa, joissa suoritetaan kudokäsittelyjä. Histologisen näytteen valmistaminen on monivaiheinen prosessi, joka tehdään ihmisestä irrotetulle kudokselle. Laboratorioon saapunut näyte on siis ainutlaatuinen. Tästäkin syystä näytteet tulisi käsitellä parhaalla mahdollisella menetelmällä, jotta patologille katsottavaksi menevä leike olisi paras mahdollinen. Huonosti kuljetettuun kudokseen jäi keskelle raaka kohta, joka ei leikkaantunut hyvin, vaan muhentui terää vasten. Muhentunutta kohtaa ei saa lasille vaan se hajoaa vesihauteeseen. Näin valmiilta lasilta voi puuttua suurikin osa alkuperäisestä kudoksesta, jolloin leike ei edusta koko näytettä. Pahimmassa tapauksessa tällaiselta leikkeeltä voidaan saada väärä diagnoosi.

Vertailussa pystyttiin osoittamaan rasvaohjelman edut normaaliohjelmaan verrattuna. Nyt laboratoriossa käytetään molempia kuduskuljetusohjelmia rutiinissa. Aihe oli ajankohtainen ja hyödyllinen. Jatkossa rasvaohjelman liuosaikoja saatetaan kokeiluluontoisesti lyhentää niin, että kuduskuljetus kestää kolmen vuorokauden sijaan kaksi vuorokautta.

LÄHTEET:

- Aho, Heikki 1990: Histologiset menetelmät patologiassa. Turku: Turun yliopisto, Kliinisteoreettinen laitos, patologia.
- Bjålie, Jan G. – Haug, Egil – Sand, Olav – Sjaastad, Øystein V. – Toverud, Kari C. 2002: Ihminen fysiologia ja anatomia 1.-2. painos. Meditrans Oy (suom.) Helsinki: Werner Söderström Oy.
- Brancroft, John (Toim.) 2002: Theory and Practice of Histological Techniques 5 Edition. Churchill Livingstone: Elsevier Health Sciences.
- Danchin Antoine 2002: Important dates 1800-1849. Verkkodokumentti. Päivitetty 28.8.2006. <www.pasteur.fr/recherche/unites/REG/causeries/dates_1800> Luettu 5.10.2006.
- Duodecim 2007: Terveyskirjasto. Astrozytooma. Verkkojulkaisu <www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00318&p_haku=astrozytooma> Luettu 27.1.2007.
- Heikkilä, Tarja 2001: Tilastollinen tutkimus. 3. uud. painos Helsinki: Edita.
- Helminen, Heikki – Komulainen, Jyrki – Pelttari, Alpo – Remola-Pärssinen, Eeva – Tammi, Raija – Vierula, Matti 1986: Histologiset menetelmät kurssi. Kuopion yliopisto: Anatomian ja patologian laitokset.
- Hintsanen, Päivi 2006: Coloria. Verkkodokumentti. Päivitetty 26.11.2006 <www.coloria.net> Luettu 30.10.2006.
- Histologisen preparaatin laadunarviointikriteerejä. Moniste. Stadia 12.2007
- Holopainen, Martti - Pulkkinen, Pekka 1996: Tilastolliset menetelmät. 1.-3. painos Porvoo: WSOY.
- Horobin, Richard W. - Bancroft, John D. 1998: Troubleshooting histology stains. New York: Churchill Livingstone.
- Houtsonen, Piia 2004: Hematoksyliini-Eosiini-värjäyksen reformointi Päijät-Hämeen keskussairaalassa. Helsinki
- Huhtakallio, Jari 1995: Patologian peruslaitteet ja menetelmät. Oulu: Oulun Liikekirjapaino.
- Junqueira, Luiz Carlos – Carneiro, Jose 2005: Basic Histology text & atlas. McGraw-Hill Medical.
- Kaisto, Tuula 2006: Tukikudosten, eli varsinaisen sidekudoksen, ja erikoistuneiden sidekudosten histologia. Oulun yliopisto: Anatomian ja solubiologian laitos.
- Kaila, Kaisi 1998: Kudoskuljetuksen yhteys kudoksenäytteen ominaisuuksiin. Pro gradu – työ. Oulun yliopisto. Hoitotieteen ja terveyshallinnon laitos.

Karttunen, Tuomo – Soini, Ylermi – Vuopala, Katri 2005: Tautioppi. Helsinki: Edita Prima Oy.

Koivula, Ulla-Maija – Suihko Kristiina – Tyrväinen, Jari 2002: Mission Possible Opas opinnäytteen tekijälle. 2. uudistettu painos. Pirkanmaan ammattikorkeakoulun julkaisusarja C. Oppimateriaalit. Nro 1. Tampere.

Labquality 23.6.2001: Histologinen tekniikka, laaduntarkkailukierros 2000.

Lounatmaa, Kari – Rantala, Immo (toim.) 1996: Biologisen Valomikroskopian Perusteet. Helsinki: Yliopistopaino.

Mondragon, Gustave 2000: Paraffin in the Histology Laboratory: An Infiltrating and Embedding Medium. HistoLogic No. 2, Nov.

Naukkarinen, Anita 2000: Histologiset värjäykset. Moodi 4-5/2000. s. 153-154. Kokkola: Art-Print.

O'Leary, Timothy J. (Ed.) 2003: Pathology Principles, Practise, and Protocols. Philadelphia: Saunders Company.

Oriola: Prolab. Microm STS-vesihaude. Käyttöohje.

Pruitt, Michael 1997: A Modified Brain Processing Schedule. Histo-Logic No. 2 sep.

Päijät-Hämeen keskussairaala: Laatukäsikirja 2006. Patologian laboratorion hyvän leikkeen kriteerit ohje.

Ross, Michael H. – Romrell, Lynn J. – Kaye, Gordon I 1995: Histology a text and atlas. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins.

Shandon 1997: Käyttöopas Pathcentre suljettu kudostenkäsittelylaite 75210150 FI.

Solunetti 2006a: Maitorauhaset. Verkkodokumentti 2006: <www.solunetti.fi> Luettu 23.11.2006.

Solunetti 2006b: Rintasyöpä. Verkkodokumentti 2006: <www.solunetti.fi> Luettu 23.11.2006.

Solunetti 2006c: Paksusuolen karsinoma. Verkkodokumentti 2006: <www.solunetti.fi> Luettu 23.11.2006.

Solunetti 2006d: Keskushermosto. Verkkodokumentti 2006: <www.solunetti.fi> Luettu 23.11.2006.

Solunetti 2006e: Paksusuoli. Verkkodokumentti 2006: <www.solunetti.fi> Luettu 21.1.2007.

Stainsfile 2005a: Science of Staining. Verkkodokumentti. Päivitetty 5.2005. <www.stainsfile.info> Luettu 27.10.2006.

Stainsfile 2005b: Staining Methods. Verkkodokumentti. Päivitetty 10.2005.

<www.stainsfile.info> Luettu 27.10.2006.

Sternberg, Stephen S 1997: Histology for Pathologists 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Surgerydoor 2004: Verkkosivut. Päivitetty 4.2005

<www.surgerydoor.co.uk/medcons/detail.asp?Recno=23069354> Luettu 15.12.2006.

Thermo 2002: Käyttöopas Shandon Exelsior™ A78410100 FI. Exelsior kehittynyt kudosprosessori.

Thermo 2006: Käyttäjän opas Shandon Exelsior™ ES A78410120FI. 2. painos.

Tissue-Tek® a: Tissue Embedding Console System, Parafiinivalukeskuksen käsikirja. Valukeskus 4714, Kylmälevy 4714.

Tissue-Tek® b: Coverslipping film leveys 24 mm LOT 3260107. Tuotepakkauksen merkinnät.

Woods, Anthony E – Ellis, Roy C (Ed.) 1994: Laboratory Histopathology A Complete Reference. New York: Churchill, Livingstone.

Yleispatologian ATK 7: Lipooma ja liposarkooma. Verkkojulkaisu. Päivitetty 20.1.2005. <www.medicine.oulu.fi/pato/opetus/YP_7_NEOPLASIA_1.htm> Luettu 12.1.2007.

Taulukot normaali- ja rasvaohjelmien liuosajoista.

Normaali kuduskäsittelyohjelma PHKS/Patologia laatujärjestelmä

Reagenssi	Lämpötila	Aika (t:min)	Tyhjiö
1. Formaliini	37 °C	0:30	Ei
2. Vesi	37 °C	0:30	Ei
3. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
4. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
5. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
6. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
7. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
8. Alkoholi abs.	37 °C	0:45	Kyllä
9. Ksyleeni	Huoneenlämpö	0:40	Kyllä
10. Ksyleeni	Huoneenlämpö	0:40	Kyllä
11. Ksyleeni	Huoneenlämpö	0:40	Kyllä
12. Parafiini	60 °C	1:00	Kyllä
13. Parafiini	60 °C	1:00	Kyllä
14. Parafiini	60 °C	1:30	Kyllä

Pitkä kuduskäsittelyohjelma PHKS/Patologia laatujärjestelmä

Reagenssi	Lämpötila	Aika (t:min)	Tyhjiö
1. Formaliini	37 °C	1:00	Ei
2. Vesi	37 °C	0:30	Ei
3. Alkoholi abs.	37 °C	7:00	Kyllä
4. Alkoholi abs.	37 °C	7:00	Kyllä
5. Alkoholi abs.	37 °C	3:00	Kyllä
6. Alkoholi abs.	37 °C	4:00	Kyllä
7. Alkoholi abs.	37 °C	4:00	Kyllä
8. Alkoholi abs.	37 °C	4:00	Kyllä
9. Ksyleeni	Huoneenlämpö	2:00	Kyllä
10. Ksyleeni	Huoneenlämpö	3:00	Kyllä
11. Ksyleeni	Huoneenlämpö	3:00	Kyllä
12. Parafiini	60 °C	6:00	Kyllä
13. Parafiini	60 °C	6:00	Kyllä
14. Parafiini	60 °C	5:00	Kyllä

Leikkautuvuuden arvioinnin kriteerit mikrotomiavaiheeseen.

BLOKKI: _____					
Mikrotomi: <u>HM 355S</u>					
Näytteen	säilöily/reikiintyminen				
trimmauksessa		5	4	3	2 1
Leikkeen repeily		5	4	3	2 1
Leikkeen reikiintyminen		5	4	3	2 1
Pyykkilautamainen poimuilu		5	4	3	2 1
Leikkeen laskostuminen		5	4	3	2 1
Leikkeen reunojen irtoaminen parafiinista		5	4	3	2 1
5	=		Ei		
säilöilyä/reikiintymistä/poimuilua/laskostumista/irtoilua					
4 = Vähän					
3 = Kohtalaisesti					
2 = Paljon					
1 = Erittäin paljon					
Leikkautuvuus yleinen arvio		4	3	2	1
4 Erinomainen, 3 hyvä, 2 Kohtalainen, 1 Huono					
Leikkeen hajoaminen vesihauteessa		5	4	3	2 1
5 = Ei hajoa, 4 = Vähän					
3 = Kohtalaisesti, 2 = Paljon, 1 = Erittäin paljon					

Mikrotomin vesihaude:

Lämminvesihaude:

Kylmälevy:

Lämpölevy:

Vedenjuoksun voimakkuus:

Trimmaus: 20 µm

Leikepaksuus 4 µm

Veitsen kulma: 10

Lopullisen leikkeen arvioinnin kriteerit.

Leikkeen Laatu:				
Reikiä	[4]	[3]	[2]	[1]
Ryppyjä	[4]	[3]	[2]	[1]
Naarmuja	[4]	[3]	[2]	[1]
Repeilyä	[4]	[3]	[2]	[1]
Leike irttoilee lasilta	[4]	[3]	[2]	[1]
Paksuusvaihtelua	[4]	[3]	[2]	[1]
Leikkeen laadun kokonaisarvio	_____ (0-3)			
[4] = ei lainkaan, [3] = vähän, [2] = kohtalaisesti, [1] = paljon 0 = huono, 1 = välttävä, 2 = tyydyttävä, 3 = hyvä				
Kudosmorfologian säilyminen:				
Yksittäiset solut selvästi näkyvillä	[4]	[3]	[2]	[1]
Tumat selvästi näkyvillä	[4]	[3]	[2]	[1]
Kokonaisarvio kudosmorfologian säilymisestä	_____ (0-3)			
[1] = ei lainkaan, [2] = vähän, [3] = kohtalaisesti, [4] = paljon 0 = huono, 1 = välttävä, 2 = tyydyttävä, 3 = hyvä				
Värjäytyminen:				
Tumavärin voimakkuus	[4]	[3]	[2]	[1]
Eosiinin voimakkuus	[4]	[3]	[2]	[1]
Tumavärin ja eosinin kontrasti	[4]	[3]	[2]	[1]
Kokonais arvio värjäytymisestä	_____ (0-3)			
[4] = hyvä, [3] = kohtalaisen hyvä, [2] = Tulkittavissa oleva näyte, mutta esim tumaväri puuttuu, [1] = huono 0 = huono, 1 = välttävä, 2 = tyydyttävä, 3 = hyvä				
Patologi arvio				
Tumien kromatiinin säilyminen:	[4]	[3]	[2]	[1]
Kromatiini tasaisesti jakautunutta	[4]	[3]	[2]	[1]
tumajyväsiä erotettavissa selvästi	[4]	[3]	[2]	[1]
Tumien värjäytyminen selvää	[4]	[3]	[2]	[1]
Kokonaisarvio tumien kromatiinin säilymisestä	_____ (0-3)			
[1] = ei lainkaan, [2] = vähän, [3] = kohtalaisesti, [4] = paljon 0 = huono, 1 = välttävä, 2 = tyydyttävä, 3 = hyvä				

Valmiin leikkeen koko blokissa olevaan kudokseen verrattuna.

- (1) sama
- (2) laajentunut
- (3) pienempi

Vertailuun käytetty materiaali. Kasetin numeron alapuolella näkyy kudokskappaleen paksuus. Kasetin vieressä käytetty ohjelma, leikkeen numero ja paksuus.

Tutkimusmateriaali

Tapaus 1 Isoaivot	Kasetti 1	N	Leike 1	4μ	Tapaus 2 Pikkuaivot	Kasetti 5	N	Leike 5	4μ	Tapaus 3 Rinta	Kasetti 9	N	Leike 9	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	Kasetti 2	R	Leike 2	4μ		Kasetti 6	R	Leike 6	4μ		Kasetti 10	R	Leike 10	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	kasetti 3	N	Leike 3	4μ		kasetti 7	N	Leike 7	4μ		kasetti 11	N	Leike 11	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
	Kasetti 4	R	Leike 4	4μ		Kasetti 8	R	Leike 8	4μ		Kasetti 12	R	Leike 12	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
Tapaus 4 Rinta sidekudosta mukana	Kasetti 13	N	Leike 13	4μ	Tapaus 5 Suoli	Kasetti 17	N	Leike 17	4μ	Tapaus 6 Suoli	Kasetti 21	N	Leike 21	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	Kasetti 14	R	Leike 14	4μ		Kasetti 18	R	Leike 18	4μ		Kasetti 22	R	Leike 22	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	kasetti 15	N	Leike 15	4μ		kasetti 19	N	Leike 19	4μ		Kasetti 23	N	Leike 23	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
	Kasetti 16	R	Leike 16	4μ		Kasetti 20	R	Leike 20	4μ		Kasetti 24	R	Leike 24	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
Tapaus 7 Isoaivot	Kasetti 25	N	Leike 25	4μ	Tapaus 8 Pikkuaivot	Kasetti 29	N	Leike 29	4μ	Tapaus 9 Lipooma	Kasetti 33	N	Leike 33	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	Kasetti 26	R	Leike 26	4μ		Kasetti 30	R	Leike 30	4μ		Kasetti 34	R	Leike 34	4μ
	3 mm					3 mm					3 mm			
	Kasetti 27	N	Leike 27	4μ		Kasetti 31	N	Leike 31	4μ		Kasetti 35	N	Leike 35	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
	Kasetti 28	R	Leike 28	4μ		Kasetti 32	R	Leike 32	4μ		Kasetti 36	R	Leike 36	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			

N = Normaaliohjelma, R = rasvaohjelma

Tutkimusmateriaali

Tapaus 11	Kasetti 41	N	Leike 41	4μ	Tapaus 12	Kasetti 45	N	Leike 45	4μ	Tapaus 13	Kasetti 49	N	Leike 49	4μ
Suoli	3 mm				Rinta	3 mm				Lipooma	3 mm			
lumenia	Kasetti 42	R	Leike 42	4μ	ihoa	Kasetti 46	R	Leike 46	4μ	Sama lipooma	Kasetti 50	R	Leike 50	4μ
mukana	3 mm				mukana	3 mm				Kuin T 9	3 mm			
	kasetti 43	N	Leike 43	4μ		kasetti 47	N	Leike 47	4μ		kasetti 51	N	Leike 51	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			
	Kasetti 44	R	Leike 44	4μ		Kasetti 48	R	Leike 48	4μ		Kasetti 52	R	Leike 52	4μ
	5 mm					5 mm					5 mm			

N = Normaali ohjelma, R = rasva ohjelma

Hematoksyliini-eosiinivärjäyksen liuosajat ja käytetyt liuokset.

Hematoksyliini-eosiini-värjäys värjäysautomaatilla	
LIUOS	AIKA min
Ksyleeni	4:00
Ksyleeni	2:00
abs. etanoli	1:00
abs. etanoli	0:30
96 % etanoli	0:30
aqua	0:30
Mayerin hemalaunliuos	7:00
juokseva vesi	5:00
0,25 % suolahappo	0:03
juokseva vesi	5:00
aqua	0:30
eosiini, käyttöliuos	3:00
96 % etanoli	1:00
96 % etanoli	1:00
abs. etanoli	1:00
abs. etanoli	1:00
Ksyleeni	15:00

Käytettävät kemikaalit

- Mayerin hemalaunliuos Merck 1.09249
- Suolahappo 37 % Merck 1.00317
- Eosiini G 0,5 % liuos Merck 1.09844
- Etikkahappo, väkevä Merck 1.00063

Suolahaposta ja eosiini G:stä valmistetaan käyttöliuokset värjäystä varten.

Rinta- ja suolikudoksen repeily mikrotomiassa

kudoksen paksuus	Käytetty kudusk.ohjelma	Kudos	Repeily	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Suoli	Ei lainkaan	6	100,0
			Kohtalaisesti	1	16,7
		Rinta	Vähän	2	33,3
			Ei lainkaan	3	50,0
			Yhteensä	6	100,0
	Rasva	Suoli	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
		Rinta	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
5-6 mm	Normaali	Suoli	Paljon	3	50,0
			Kohtalaisesti	1	16,7
			Ei lainkaan	2	33,3
			Yhteensä	6	100,0
		Rinta	Erittäin paljon	2	33,3
			Paljon	2	33,3
			Vähän	2	33,3
			Yhteensä	6	100,0
	Rasva	Suoli	Ei lainkaan	6	100,0
			Vähän	3	50,0
		Rinta	Ei lainkaan	3	50,0
			Yhteensä	6	100,0

Rinta- ja suolikudoksen reikiintyminen mikrotomiassa

kudoksen paksuus	Käytetty kudusk.ohjelma	Kudos	Reikiintyminen	Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	Suoli	Kohtalaisesti	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
		Rinta	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
	Rasva	Suoli	Kohtalaisesti	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
		Rinta	Yhteensä	6	100,0
			Ei lainkaan	6	100,0
5-6 mm	Normaali	Suoli	Erittäin paljon	1	16,7
			Paljon	2	33,3
			Kohtalaisesti	1	16,7
			Vähän	1	16,7
		Rinta	Ei lainkaan	1	16,7
			Yhteensä	6	100,0
			Erittäin paljon	2	33,3
			Paljon	3	50,0
	Rasva	Suoli	Kohtalaisesti	1	16,7
			Yhteensä	6	100,0
		Rinta	Ei lainkaan	6	100,0
			Ei lainkaan	6	100,0

Kaikkien kudosten pyykkilautamainen poimuilu mikrotomiassa

Kudos	kudoksen paksuus	Käytetty kudost.ohjelma	Leikkeen pyykkilautamainen poimuilu	Frekvenssi	Prosenttia
Isoaivo	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Pikkuaivo	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Suoli	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
Rinta	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Erittäin paljon	1	16,7
			Ei lainkaan	4	66,7
			Yhteensä	5	83,3
			Puuttuvat	1	16,7
			Yhteensä	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
Lipooma	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	3	75,0
			Puuttuvat	1	25,0
		Rasva	Yhteensä	4	100,0
			Ei lainkaan	4	100,0

Leikkeiden laskostuminen mikrotomiavaiheessa kaikilla kudostyypeillä.

Kudos	kudoksen paksuus	Käytetty kudostyypin ohjelma	Leikkeen laskostuminen	Frekvenssi	Prosenttia
Isoaivo	2-3 mm	Normaali	Vähän	1	25,0
			Ei lainkaan	3	75,0
			Yhteensä	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Pikkuaivo	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Suoli	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
Rinta	2-3 mm	Normaali	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Erittäin paljon	1	16,7
			Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	4	66,7
		Rasva	Yhteensä	6	100,0
			Ei lainkaan	6	100,0
Lipooma	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	3	75,0
			Puuttuu	1	25,0
			Yhteensä	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0

Leikkeiden reunojen irtoilu parafiinistä kaikissa kudoksissa

Kudos	kudoksen paksuus	Käytetty kudost.ohjelma	Reunojen irtoilu parafiinista	Frekvenssi	Prosenttia
Isoaivo	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Pikkuaivo	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
Suoli	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Kohtalaisesti	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
			Rasva	6	100,0
Rinta	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	6	100,0
		Rasva	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
	5-6 mm	Normaali	Paljon	1	16,7
			Kohtalaisesti	1	16,7
			Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	3	50,0
			Yhteensä	6	100,0
		Rasva	Vähän	1	16,7
			Ei lainkaan	5	83,3
			Yhteensä	6	100,0
Lipooma	2-3 mm	Normaali	Ei lainkaan	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0
	5-6 mm	Normaali	Paljon	1	25,0
			Ei lainkaan	2	50,0
			Yhteensä	3	75,0
			Puuttuu	1	25,0
			Yhteensä	4	100,0
		Rasva	Ei lainkaan	4	100,0

Patologien arvio kudosemorphologian säilymisestä.

Kudoksen paksuus	Käytetty ohjelma		Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	tydyttävä	1	7,1
		hyvä	13	92,9
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	hyvä	14	100,0
5-6 mm	Normaali	tydyttävä	5	35,7
		hyvä	7	50,0
		Yhteensä	12	85,7
		Puuttuu	2	14,3
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	tydyttävä	2	14,3
		hyvä	12	85,7
		Yhteensä	14	100,0

Patologien arvio leikkeen värjäytymisestä kokonaisuudessaan.

Kudoksen paksuus	Käytetty ohjelma		Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	hyvä	14	100,0
	Rasva	hyvä	14	100,0
5-6 mm	Normaali	tydyttävä	1	7,1
		hyvä	11	78,6
		Total	12	85,7
		Puuttuu	2	14,3
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	hyvä	14	100,0

Patologien arvio tumien kromatiinin säilymisestä kokonaisuudessaan.

Kudoksen paksuus	Käytetty ohjelma		Frekvenssi	Prosenttia
2-3 mm	Normaali	tydyttävä	1	7,1
		hyvä	13	92,9
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	hyvä	14	100,0
5-6 mm	Normaali	tydyttävä	5	35,7
		hyvä	7	50,0
		Yhteensä	12	85,7
		System	2	14,3
		Yhteensä	14	100,0
	Rasva	tydyttävä	3	21,4
		hyvä	11	78,6
		Yhteensä	14	100,0